

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental

Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas

Bianca Alves Dias Martins

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DO
ETANOL EM CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS NECESSÁRIAS
DOS NUTRIENTES NITROGÊNIO E FÓSFORO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental na área de Tecnologia de Saneamento Ambiental.

Orientador: Henry Xavier Corseuil

Florianópolis
Santa Catarina
Março, 2004

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as diversas formas de apoio que recebi durante o período do mestrado. A lista de agradecimentos é extensa e não poderia deixar de incluir em especial:

- Ao Professor e Orientador Dr. Henry Xavier Corseuil pelas críticas e sugestões indispensáveis para a concretização deste trabalho, além de toda disponibilização de local e material apropriado para a pesquisa.
- Agradeço, principalmente, a Madalena e Marcela pelas ajudas indispensáveis, dedicação e pela amizade durante a confecção de todo o trabalho. Gostei muito de trabalhar com vocês! E com certeza sem vocês esse trabalho não sairia!
- Ao Professor Alexandre Verzani Nogueira do Departamento de Microbiologia pela disponibilização de local e de uma capela laminar onde foi realizado o experimento.
- Ao professor Agenor pela acessoria na parte da cinética de degradação e ao Prof Davide pelo auxílio com o programa estatística e de sua incansável disposição.
- À Universidade Federal de Santa Catarina, que além de pública e gratuita, proporcionou toda infra-estrutura necessária para que eu pudesse realizar o mestrado em Engenharia Ambiental.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através de bolsa de estudo pelo programa CTHidro.
- Ao projeto PETROBRAS pelo apoio financeiro, possibilitando o trabalho de laboratório.
- Aos os Professores do curso de Pós-Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina.
- Ao Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA), do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade de Santa Catarina (UFSC).
- Aos colegas de disciplinas: Francyne, Dariana, Alessandra, Iria, Fiorella, Flávio, Fabíola, Jeverson, Waldir e aos colegas de laboratório REMAS que sempre estiveram dispostos a ajudar e ensinar: Lilian, Marivânia, Sílvia, Márcio, Hellen, Alexandre, Érico, Carlos, Cristina, Daise, Cristiane, Leandra e Gabriel. Sandro, muito obrigada pela leitura do trabalho e pertinentes sugestões.
- A Cátia pela grande ajuda com o microscópio.
- Ao Márcio Busi e Luciana Beneti pelas valiosas informações e paciência.

- À minha família pelo amor e confiança sempre depositados em mim.
- Ao Tuco pelo amor, apoio, paciência, carinho e por ler o trabalho. Lindo, você me ajudou muito, foi essencial e decisivo para dar-me tranquilidade no desenvolvimento do trabalho e com certeza essa paz que irá me acompanhar por toda minha vida.
- À Florianópolis, especialmente a Praia da Joaquina, com sua gente e sua magia, por ter me acolhido e ter sido um local muito agradável para realização do mestrado.
- Enfim, à todos que, embora não mencionados, possam também ter contribuído para a execução desse trabalho.

Escassez e mau uso da água doce representam sérios e crescentes problemas que ameaçam o desenvolvimento sustentável e a proteção do ambiente.

Saúde humana e bem-estar, produção segura de comida, desenvolvimento industrial e ecossistemas dos quais estes dependem estão todos ameaçados, a menos que os recursos de água doce e solo sejam utilizados de forma mais eficiente nas próximas décadas e muito mais do que têm sido até agora.

**Conferência Internacional de Água e Desenvolvimento Sustentável
Dublin, Irlanda 1992**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. OBJETIVO GERAL	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO	6
3.2. BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA	8
3.3. BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA	9
3.4. FONTES DE ENERGIA E CARBONO PARA AS CÉLULAS MICROBIANAS.....	13
3.5. REQUISITOS NUTRICIONAIS.....	13
3.6. EFEITO DO ETANOL NO CRESCIMENTO MICROBIANO	17
3.7. CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO	17
3.8. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	19
3.9. CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. MICROCOSMOS - EXPERIMENTO AERÓBIO	33
4.2. MICROCOSMOS EXPERIMENTO ANAERÓBIO	35
4.3. AMOSTRAGEM.....	36
4.4. INÓCULO CELULAR	37
4.5. OBTENÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTE	37
4.5.1. <i>Solução nutriente</i>	38
4.6. PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	39
4.7. CONTAGEM CELULAR	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. INTRODUÇÃO	42
5.2. BIODEGRADAÇÃO DO ETANOL	42
5.2.1. <i>Biodegradação aeróbia do etanol</i>	42
5.2.1.1. Determinação dos parâmetros biocinéticos de biodegradação aeróbia do etanol	42
5.2.1.2. Influência do nutriente nos parâmetros biocinéticos	44
5.2.1.3. Curvas obtidas no experimento e a comparação com o modelo testado.....	50
5.2.1.4. Análise do crescimento bacteriano em função das diferentes disponibilidades de nutrientes	54
5.2.2. <i>Biodegradação anaeróbia do etanol</i>	56
5.2.2.1 Comparação do experimento aeróbio com o experimento anaeróbio.....	56
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	58
6.1. CONCLUSÕES.....	58
6.2. RECOMENDAÇÕES	61
APÊNDICE I	62
APÊNDICE II	64

APÊNDICE III	66
APÊNDICE IV	68
APÊNDICE V	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Passos naturais do processo anaeróbico (fonte: GRADY <i>et al</i> , 1999).....	12
Figura 2 – Modelo de curva de crescimento: (1) Fase de aclimação, (2) Fase exponencial, (3) Fase estacionária e (4) Fase de declínio. (Fonte: TORTORA <i>et al.</i> , 2000).....	18
Figura 3 – Representação gráfica da relação entre taxa de crescimento bacteriano e a concentração do substrato como fonte de energia (Fonte: ALEXANDER, 1994).....	27
Figura 4. Curvas de degradação para substratos que são metabolizados por diferentes tipos de cinética. (Fonte: ALEXANDER, 1994).....	31
Figura 5- Câmara laminar para montagem do experimento.....	34
Figura 6 – Concentração do etanol por tempo em todos os tratamento.....	45
Figura 7 – $\mu_{\text{máx}}$ em todos os tratamento.....	45
Figura 8 – K_s em todos os tratamento.....	45
Figura 9 – Número de células/mL e concentração do etanol por tempo no tratamento com concentração ideal de nutriente.....	47
Figura 10 – Concentração do substrato por velocidade específica de crescimento bacteriano num dado instante para a concentração ideal de nutrientes	47
Figura 11 – Número de células/mL e concentração do etanol por tempo no tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente.....	48
Figura 12 – Concentração do substrato por velocidade específica de crescimento bacteriano num dado instante para 20% da concentração ideal de nutriente.....	48
Figura 13 – Número de células/mL e concentração do etanol por tempo no tratamento sem adição de nutriente.....	49
Figura 14 – Concentração do substrato por velocidade específica de crescimento bacteriano num dado sem adição de nutriente.....	49
Figura 15 – Número de células/mL e concentração do etanol por tempo no tratamento sem adição de nutriente.....	50
Figura 16 – Dados simulados e experimentais do substrato para o tratamento com a concentração ideal de nutriente.....	51
Figura 17 – Dados simulados e experimentais da biomassa para o tratamento com com a concentração ideal de nutriente.....	51
Figura 18 – Dados simulados e experimentais do substrato para o tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente.....	52
Figura19 – Dados simulados e experimentais da biomassa para o tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente.....	52
Figura 20 – Dados simulados e experimentais do substrato para o tratamento sem nutriente.....	53
Figura 21 – Dados simulados e experimentais da biomassa para o tratamento sem nutriente.....	53
Figura 22 – Número de células/mL por tempo em todos tratamentos.....	54
Figura 23 – Concentração do etanol por tempo nos quatro tratamentos – EXPERIMENTO ANAERÓBIO.....	57
Figura 24 – Cromatograma de uma amostra com a curva de calibração do etanol.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de recuperação do “fortificado” obtido para análises do etanol em CG	
HP5890.....	40
Tabela 2: Obtenção de μ_{max} e K_s para os três tratamentos.....	44
Tabela 3 - Composição do meio MSB (STAINER <i>et al.</i> , 1966).....	63
Tabela 4 - Condições de trabalho utilizadas no Headspace HP7694.....	67
Tabela 5 - Condições de trabalho utilizadas no Cromatógrafo à gás HP5890.....	67
Tabela 6 - Experimento de biodegradação aeróbia de 112,32 mg/L de etanol – sem nutriente.....	69
Tabela 7 - Experimento de biodegradação aeróbia de 112,32 mg/L de etanol –20% da concentração ideal mínima de nutriente.....	69
Tabela 8 - Experimento de biodegradação aeróbia de 112,32 mg/L de etanol – concentração ideal de nutriente.....	70
Tabela 9 - Experimento de biodegradação aeróbia de 112,32 mg/L de etanol – tratamento controle.....	70
Tabela 10 - Experimento de biodegradação anaeróbia de 1000,00 mg/L de etanol – tratamento controle.....	72
Tabela 11 - Experimento de biodegradação anaeróbia de 1000,00 mg/L de etanol – tratamento sem nutriente.....	72
Tabela 12 - Experimento de biodegradação anaeróbia de 1000,00 mg/L de etanol – tratamento com 20% da concentração ideal mínima de nutriente.....	73
Tabela 13 - Experimento de biodegradação anaeróbia de 1000,00 mg/L de etanol – tratamento 100% da concentração ideal mínima de nutriente.....	73
Tabela 14 - Número de células/mL em função do tempo de degradação de 112,32 mg/L de etanol – tratamento controle.....	75
Tabela 15 - Número de células/mL em função do tempo de degradação de 112,32 mg/L de etanol – tratamento sem adição de nutriente.....	75
Tabela 16 - Número de células/mL em função do tempo de degradação de 112,32 mg/L de etanol – 20% da concentração ideal mínima de nutriente.....	76
Tabela 17 - Número de células/mL em função do tempo de degradação de 112,32 mg/L de etanol – 100% da concentração ideal mínima de nutriente.....	76

RESUMO

Numerosos incidentes que prejudicam o meio ambiente, como a contaminação de sistemas de águas subterrâneas por vazamentos em postos de combustíveis, merecem cada vez mais a atenção da população e dos órgãos de controle ambiental. A contaminação do solo e de águas subterrâneas por petróleo e seus derivados vem decorrendo em consequência de vazamentos nos tanques de estocagem, disposição inadequada ou acidentes nos processos de transportes destes produtos. A gasolina brasileira diferencia-se da gasolina de outros países, pois é misturada com 20-26% de etanol. Essa particularidade acarreta interações entre este e os outros compostos tóxicos constituintes da gasolina, tais como o benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno, que são de particular importância pela relativa solubilidade nos sistemas de águas subterrâneas, além do potencial cancerígeno e depressivo do sistema nervoso central. O etanol influencia diretamente no transporte destes compostos tóxicos em sistemas de águas subterrâneas. Mais especificamente, o etanol, pode inibir ou reduzir a taxa de biodegradação dos compostos BTEX por preferencialmente consumir os receptores de elétrons e nutrientes, além de aumentar a concentração aquosa desses compostos devido ao efeito de cosolvência. Desta forma, a presença de etanol no aquífero por longos períodos de tempo fará com que as plumas dos compostos mais tóxicos, como o benzeno, se desloquem e atinjam pontos mais afastados da fonte onde ocorreu o derramamento, podendo atingir aquíferos que são utilizados como fontes de abastecimento de água para consumo humano. Os fatores que influenciam os mecanismos de ação microbiana na degradação de compostos orgânicos de interesse merecem considerável atenção como alternativas para otimização das tecnologias de biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminados pela gasolina, tendo em vista que o etanol pode esgotar os nutrientes necessários à degradação dos compostos tóxicos. Assim, o objetivo principal desta pesquisa é analisar e discutir o comportamento dos parâmetros cinéticos de biodegradação do etanol, sob condições limitantes dos nutrientes nitrogênio e fósforo. Os experimentos de biodegradação aeróbia e anaeróbia do etanol foram realizados em microcosmos contendo a concentração do etanol, meio com sais nutrientes e solo de um aquífero não contaminado, localizado no sul da Ilha de Florianópolis. As análises de degradação dos compostos foram realizadas por cromatografia gasosa e a produção de biomassa ativa estimada através do volume celular obtido por contagem em microscópio óptico de fluorescência. Através da cinética de Monod foi possível descrever a relação entre a taxa aeróbia de degradação, máxima de utilização do substrato $\mu_{\text{máx}}$ e as constantes de meia-velocidades K_s , do etanol. Foi quantificado o efeito de concentrações ideal e limitante de nitrogênio e fósforo nesses parâmetros, bem como no crescimento bacteriano. Todo o etanol adicionado foi degradado em 53 e 149 horas nos tratamentos com concentração ideal de nutrientes e 20% desta, respectivamente. Já na ausência de nutrientes, em 802 horas não ocorreu a degradação total. Os parâmetros cinéticos de degradação do substrato, $\mu_{\text{máx}}$ e K_s , foram, respectivamente, $1,30\text{d}^{-1}$ e $21,22\text{ mg/L}$ para o tratamento com concentração ideal de nutriente, $2,50\text{ d}^{-1}$ e $192,99\text{ mg/L}$ para o tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente e $0,197\text{ d}^{-1}$ e $121,10\text{ mg/L}$ para o tratamento sem nutriente. As maiores concentrações celulares foram de $9,89 \times 10^7$ células/mL (em 125 horas); 4×10^7 células/mL (em 77 horas); $3,63 \times 10^7$ células/mL (em 346 horas), nos tratamentos com concentração ideal de nutriente, 20% deste, e sem adição de nutrientes, respectivamente. Foram apresentados também, resultados preliminares do experimento anaeróbio. Esses resultados contribuem para avaliação do processo de atenuação natural em derramamentos subsuperficiais de combustíveis.

ABSTRACT

Several environmentally harmful incidents require a more energetic response and attention from the general population and "environment regulatory agencies". The contamination of soil and groundwater by oil and its derivatives is the result of reservoir leakages, inadequate disposal or transportation accidents. The gasoline produced in Brazil differs from the one produced in other countries in the fact that the former one is mixed with ethanol (20-26%). This results in interactions between the ethanol itself and other toxic compounds present in gasoline, such as benzene, toluene, ethyl-benzene and xylene (BTEX). All these toxic compounds are particularly important because of their relative solubility in the groundwater systems, besides of their carcinogenic and central nervous system depressing properties. The transport of BTEX compounds in groundwater systems is directly influenced by ethanol, which might inhibit or reduce the biodegradation rate of these compounds. This occurs since ethanol would preferably consume either electron acceptors and/or soil nutrients, as well as increase the concentration of BTEX compounds in the water due to co-solvency effect. Therefore, the presence of ethanol in the water for long periods of time will promote transport of the most toxic compounds to farther locations, potentially reaching sources of water used for human consumption. Ethanol may lead to fast depletion of nutrients necessary for the degradation of toxic compounds, thus directly influencing the kinetic parameters of biodegradation. Therefore, factors affecting the microbial mechanisms of organic compounds degradation, such as limited nutrient, deserve considerable attention as alternatives for the optimization of gasoline-contaminated soil and groundwater bioremediation technologies. Usually the presence of nutrients is not important for the degradation of oil hydrocarbons, due to their low solubility in water. However, when ethanol is present in Brazilian gasoline spillings, the presence of nutrients will influence the biodegradation of ethanol and consequently the biodegradation of BTEX. Hence, the main goal of this project is to analyse and discuss the behavior of the kinetic parameters of ethanol biodegradation under limited availability of nitrogen and phosphorus. The experiments measuring aerobic and anaerobic degradation of ethanol were performed in a microcosmos reproducing the environment of a non-contaminated water source in the southern region of the Florianópolis island. The analysis of the degradation of compounds was performed by gas-chromatography and the active biomass yield was estimated by cellular volume counting using fluorescence microscopy. Using Monod's kinetics, it was possible to describe the relationship between the aerobic degradation rate. The effects of limiting and ideal concentrations of nitrogen and phosphorus were quantified in Kinetics parameters and in bacterial growing. All ethanol added was degraded in 53 and 149 hours in the treatments with ideal nutrient concentration off and 20% off this, respectively. Already in the nutrient absence, in 802 hours the total degradation did not occur. The kinetics parameters of degradation, μ_{max} and K_s , were, respectively, $1,30\text{d}^{-1}$ and $21,22\text{ mg/L}$ in the treatment with ideal nutrient concentration, $2,50\text{ d}^{-1}$ and $192,99\text{ mg/L}$ in the treatments with 20% off ideal nutrient concentration, finally, $0,197\text{ d}^{-1}$ and $121,10\text{ mg/L}$ in the nutrient absence. The biggest cellular concentrations were gotten, as maximum value of biomass $9,89 \times 10^7$ cells/ml (in 125 hours); 4×10^7 cells/ml (in 77 hours); $3,63 \times 10^7$ cells /ml (in 346 hours), in the treatments with ideal concentration of nutrient, 20% of this, and without addition of nutrients, respectively. Also, there are preliminary results of anaerobic experiments. These results contribute to the evaluation of the natural attenuation process in underground fuel leakages.

1. INTRODUÇÃO

O equilíbrio com o meio ambiente é fundamental para a vida satisfatória do ser humano. A satisfação do viver implica, necessariamente, em boas condições de saúde. Não existe bem estar completo na ausência de condições adequadas de saúde individual e coletiva. A própria saúde é por definição uma situação de bem estar físico, psíquico e social. Desta maneira, o meio ambiente torna-se fator condicionante da saúde do homem (COMISSÃO ORGANIZADORA DO RELATÓRIO ESTADUAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO, 1992).

Questões ambientais relacionadas a água subterrânea no Brasil estão cada vez mais tendo atenção por serem grandes potenciais de água que flui subsuperficialmente. As reservas de água subterrânea móveis são estimadas em 112.000 km³, sendo que cerca de 5.000 m³/hab/ano poderiam ser extraídos de forma racional (REBOUÇAS *et al.*, 1999).

Diversos acidentes ambientais envolvendo a contaminação de aquíferos e solos por hidrocarbonetos de petróleo vêm ocorrendo nas últimas décadas. Entre esses, acidentes com tanques de armazenamento de combustível dos postos de gasolina, que geralmente ficam enterrados no subsolo tem ocorrido com frequência. Possíveis fraturas ou rachaduras nos tanques permitem o vazamento de derivados de petróleo para o solo e para o aquífero (FREITAS, 1997). A existência de vazamentos nestes tanques é, muitas vezes, desconhecida. Por exemplo, a Prefeitura Municipal de Joinville (SC) fiscalizou 65 postos da cidade, constatando que apenas um não continha problema de infiltração de gasolina no lençol freático (CORSEUIL AND MARINS, 1997; CORSEUIL, 1997; FINOTTI AND CORSEUIL, 1997).

A gasolina é um derivado do petróleo, constituída de uma mistura complexa de mais de duzentos compostos com diferentes características. Entre esses compostos, o benzeno, etilbenzeno, tolueno e xilenos (BTEX) são de particular importância por serem tóxicos, mesmo em baixas concentrações, e pela relativa solubilidade, comparada com outros derivados do petróleo, podendo migrar através dos sistemas de águas subterrâneas contaminando possíveis fontes de água potável (EDWARDS AND GRBIC-GALIC, 1994; COZZARELLI *et al.*, 1995). Mais especificamente, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA), o benzeno apresenta potencial cancerígeno e o tolueno pode causar depressão do sistema nervoso central (BELLER *et al.*, 1992). Desta forma, concentrações de benzeno, tolueno, xilenos e etilbenzenos superiores a 10, 700, 500 e 300 µg/L respectivamente, comprometem a potabilidade

da água para consumo humano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993). No Brasil, a legislação vigente discrimina dentre estes compostos, apenas o benzeno limitando a sua concentração em 10 µg/L (CONAMA, 1986).

A gasolina brasileira apresenta o diferencial de ter em sua composição, além dos BTEX, 20-26% de etanol (anidro). O acréscimo de etanol, para aumentar a octanagem na gasolina, reduz a poluição do ar, além do benefício econômico, por ser um combustível renovável reduzindo o uso do petróleo (POWERS, 2001). Entretanto, essa diferença na formulação da gasolina causa um efeito negativo, relacionado diretamente aos compostos BTEX, muito maior do que os mesmos puros em contaminações de aquíferos. Segundo Corseuil *et al.* (2002), um dos fatores é a depleção dos receptores de elétrons causado pelo etanol, que inibe ou retarda a degradação dos compostos monoaromáticos e poliaromáticos. Isso pode ocorrer por serem os compostos BTEX degradados por enzimas que podem ser reprimidas quando substratos facilmente degradados, como etanol, estão presentes em altas concentrações (MONOD, 1949; DUETZ *et al.*, 1994; DUETZ *et al.*, 1996). Outro fato importante, refere-se ao etanol ser energeticamente mais favorável a ser biodegradado, por exemplo, sua degradação preferencial a degradação do benzeno, como foi demonstrado em experimentos de microcosmos por Corseuil *et al.*, 1998. Além desses fatores, ocorre um aumento da massa dos compostos BTEX na fase aquosa ocasionando uma contaminação nos aquíferos mais complexa quando ocorrem misturas do etanol na gasolina do que a contaminação produzida somente pela gasolina pura. Resumidamente, o etanol pode interferir diretamente na solubilização dos compostos tóxicos BTEX e nas taxas de degradação microbiana (FERNANDES & CORSEUIL, 1997; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996b; CORSEUIL & ALVAREZ, 1997; CORSEUIL *et al.*, 1998; HUNT *et al.*, 1997). Vale salientar que quanto maior a concentração do etanol mais se assentam os efeitos negativos dos compostos BTEX.

Além da adição do etanol na gasolina brasileira, o etanol também é utilizado puro, como combustível, na sua forma hidratada. Nesse caso, podem ocorrer derramamento de etanol simultâneo a outros combustíveis como gasolina tendo como causa um efeito negativo muito maior do que se o aquífero fosse contaminado somente com gasolina, retardando o processo de atenuação natural. No caso dos derramamentos simultâneos os efeitos negativos do etanol são acentuados, como mencionados anteriormente por ocorrer maior concentração do etanol.

Uma estratégia de recuperação de ambientes contaminados por compostos combustíveis que tem mostrado bom custo-benefício é a degradação dos contaminantes por microrganismos (WALTER & CRAWFORD, 1997). A biorremediação destaca-se por eliminar uma grande quantidade de contaminantes orgânicos a uma boa relação custo-benefício (MONTGOMERY *et al.*, 1997; KORDA *et al.*, 1997).

O processo consiste na degradação de compostos orgânicos de interesse, encontrados nos solos ou águas subterrâneas, por microrganismos que os utilizam metabolicamente para manutenção celular e produção de biomassa (WALTER AND CRAWFORD, 1997).

A eficiência dos sistemas biológicos na biorremediação é extremamente dependente das propriedades cinéticas do crescimento populacional dos microrganismos e das taxas de degradação do substrato. Condições limitantes de nutrientes podem reprimir a degradação dos compostos BTEX (DUETZ *ET AL.*, 1994; DUETZ *ET AL.*, 1996), influenciando diretamente nos parâmetros da cinética de biodegradação. Assim, a determinação destes parâmetros torna-se essencial para o desenvolvimento de estratégias de remoção de compostos poluentes (KLECKA AND MAIER, 1985). Em alguns casos pode ser necessária a interferência antrópica como a modificação de condições abióticas que limitam o crescimento microbiano. Como exemplo, podemos citar a introdução de nutrientes juntamente com organismos alóctones ou somente a introdução de nutrientes ou microrganismos. Uma outra situação é não haver interferência nenhuma, deixando que os microrganismos indígenas degradem os contaminantes em condições naturais.

O estudo da cinética microbiana pode ser útil para avaliar a persistência dos compostos químicos em ecossistemas naturais, bem como as respectivas concentrações em que estes compostos estão sendo transportados a possíveis sítios em que o homem e outras espécies estejam em exposição (JONES AND ALEXANDER, 1986; ALEXANDER, 1994).

O etanol interfere drasticamente na cinética de biodegradação dos compostos tóxicos derivados de petróleo em derramamentos subsuperficiais. Normalmente a baixa solubilidade dos hidrocarbonetos de petróleo na água faz com que a presença de nutrientes não seja importante para a degradação destes, já que existe um tempo para o ambiente se recompor. No entanto, em caso de derramamentos de gasolina com etanol, altas concentrações do álcool podem estar presentes na água subterrânea. Neste caso, a presença do nutriente influenciará na biodegradação do etanol e, em consequência, a dos BTEX. O etanol demanda grande concentração de nutriente

em curto período de tempo. Os fatores que influenciam os mecanismos de ação microbiana na degradação de compostos orgânicos de interesse, como condições limitantes de nutrientes, merecem considerável atenção como alternativas para otimização das tecnologias de biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminados pela gasolina, tendo em vista que o etanol pode esgotar os nutrientes necessários à degradação dos compostos tóxicos, influenciando diretamente nos parâmetros cinéticos de biodegradação. Consequentemente, a concentração de nutrientes torna-se determinante para evitar que os compostos BTEX permaneçam mais tempo no ambiente migrando para áreas mais afastadas da fonte, podendo causar danos diretos ou indiretos ao homem e meio ambiente. Assim, tem-se como objetivo avaliar a influência das concentrações mínimas necessárias ao metabolismo celular dos nutrientes nitrogênio e fósforo, nos parâmetros cinéticos de biodegradação aeróbia do etanol. Como resultado espera-se contribuir para o desenvolvimento de bases racionais entre as possíveis soluções para otimizar ou monitorar tecnologias que visam amenizar o impacto de compostos derivados de petróleo no ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na biodegradação do etanol buscando respostas para o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes para derramamentos de gasolina em águas subterrâneas.

2.2. Objetivos específicos

Determinar os parâmetros cinéticos de biodegradação aeróbia do etanol: taxas de crescimento máximo específico ($\mu_{\text{máx}}$) e as constantes de meia-velocidade (K_s) utilizando microcosmos constituídos de solo de um aquífero não contaminado localizado no sul da Ilha de Florianópolis. Deseja-se determinar a influência dos nutrientes, nitrogênio e fósforo na cinética de degradação aeróbica do etanol.

Analisar o crescimento bacteriano aeróbio de espécies de bactérias encontradas no solo sob concentrações mínimas necessárias de nutrientes e quantificar a biomassa bacteriana ao longo do tempo para as diferentes concentrações de nutrientes.

Análise preliminar da degradação anaeróbia, também em experimentos com microcosmos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Processos de biodegradação e biorremediação

A biodegradação consiste na capacidade dos organismos decompor substâncias através de processos naturais, como a utilização por microorganismos, de compostos químicos naturais ou sintéticos como fonte de carbono, energia, nitrato, potássio, enxofre ou outros elementos necessários a suas células (LINCOLN *et al.*, 1998).

A biodegradação pode ser dividida em três categorias: (a) mineralização, onde os químicos orgânicos são transformados a compostos químicos inorgânicos como dióxido de carbono, água e amônia; (b) biotransformação, onde os compostos orgânicos químicos são transformados em estruturas menores e (c) co-metabolismo, onde outro composto é metabolizado primeiramente ou simultaneamente a um composto específico (DALTON, 1982).

Comunidades naturais de microorganismos em diferentes habitats têm uma grande versatilidade fisiológica. Elas são capazes de metabolizar e frequentemente mineralizar um grande número de moléculas orgânicas (ALEXANDER, 1994). As substâncias biodegradáveis no ambiente aquático podem ser transformadas quimicamente por organismos através de enzimas específicas, liberando energia, mas consumindo oxigênio, ou outro receptor de elétron do meio, resultando na depleção dos mesmos em certos casos (BARBIERI, 2000). Deste modo, a presença de receptores de elétrons, além de nutrientes como nitrogênio, fósforo, minerais traços e poluentes orgânicos, dão suporte ao crescimento microbiano e são convertidas, em séries, a produtos de oxidação que geralmente terminam em dióxido de carbono e água (FLATHMAN *et al.*, 1994). Na ausência de oxigênio, microorganismos anaeróbios começam a se sobressair nas atividades de degradação, utilizando como receptores de elétrons o nitrato, o íon férrico, o sulfato e o dióxido de carbono com menores transferências de energia, respectivamente (CHO *et al.*, 1997; LIBELO *et al.*, 1997).

A biodegradação de um substrato orgânico particular pode ser obtida por microorganismos que estão: a) crescendo diretamente em função do substrato específico como única fonte de energia; b) crescendo sobre outro nutriente orgânico como fonte de carbono e energia, assim metabolizando o substrato de interesse ou não utilizando o substrato para o crescimento celular (ALEXANDER, 1994). Segundo Arinbasarov *et al.* (1997), cerca de 20 espécies de microorganismos foram isolados e são capazes de degradar os componentes do

petróleo, sendo que mais de 70% pertencem ao gênero *Pseudomonas*. O restante pertence aos gêneros *Rhodococcus* e *Xanthomonas*. Geralmente, são as bactérias que possuem papel central na biorremediação, entretanto, outros microorganismos como fungos e protozoários também podem contribuir (WATANABE, 2001).

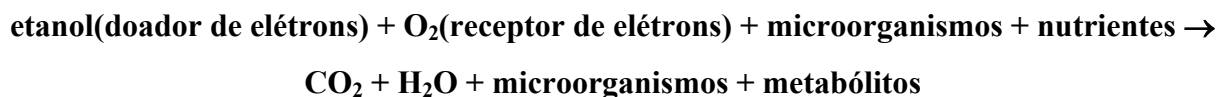
A biorremediação é um exemplo da aplicação de um processo natural, a biodegradação. A biorremediação, que é a habilidade de microorganismos como certas bactérias e determinados fungos degradarem contaminantes químicos e compostos tóxicos, possibilita a despoluição de áreas contaminadas. Os compostos químicos contaminantes podem ser degradados por microorganismos autóctones (atenuação natural) ou alóctones (bioestimulação), encontrados em solos e em águas subterrâneas (CORSEUIL & MARINS, 1996; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996a). A biorremediação tem sido uma das mais empregadas tecnologias para descontaminação de uma enorme variedade dos compostos contaminantes, incluindo os hidrocarbonetos de petróleo (WALTER & CRAWFORD, 1997). A degradação de hidrocarbonetos de petróleo por microorganismos pode, por exemplo, diminuir o custo das estratégias de tratamento do contaminante *in situ* (MONTGOMERY *et al.*, 1997; KORDA *et al.*, 1997).

A eficiência da biorremediação depende da biota (microorganismos com enzimas capazes de degradar o contaminante), das propriedades do contaminante (o contaminante tem que estar biodisponível), das condições físico-químicas da água tais como pH adequado e temperatura adequada, da biodisponibilidade dos nutrientes necessários aos microorganismos, da presença de receptores de elétrons, da ausência de substâncias tóxicas aos microorganismos e de um grau de biodegradação maior do que o grau de migração da água subterrânea (NRIAGU, 1989; ALEXANDER, 1994; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996). O monitoramento destes parâmetros permite avaliar e compreender a cinética microbiana mostrando a persistência dos compostos químicos no ambiente, como as respectivas concentrações em que estes podem estar sendo transportados a possíveis sítios de exposição ao homem e outras espécies (ALEXANDER, 1994).

Sendo assim, estudos sobre fatores que influenciam os mecanismos de ação microbiana na degradação de compostos orgânicos de interesse são de extrema importância já que podem otimizar as tecnologias de biorremediação, auxiliando nos processos de descontaminação de águas subterrâneas.

3.2. Biodegradação aeróbia

A degradação aeróbica dos contaminantes encontrados no subsolo ocorre através do oxigênio disponível pela sua difusão através da zona não saturada e pelo seu transporte nos movimentos das águas subterrâneas (AXELROD *et al.*, 1997). A biodegradação do etanol e de hidrocarbonetos é uma reação de oxidação-redução realizada durante o processo respiratório microbiano, na qual estes são oxidados, ou seja, doam elétrons a um receptor. Desta forma, microorganismos presentes no solo podem consumir os hidrocarbonetos de petróleo, se estes forem utilizados como fonte de doadores de elétrons para o metabolismo microbiano para obtenção de energia, produção e manutenção celular, como demonstra a seguinte equação (GRADY *et al.*, 1999):



Os doadores de elétrons, neste caso, são os compostos orgânicos como o etanol. A maioria dos compostos orgânicos poluentes são primeiramente degradados aerobicamente (BELLER *et al.*, 1992; EDWARDS & GRBIC-GALIC, 1992; GRADY *et al.*, 1999), isto é, quando o oxigênio está presente como receptor final de elétrons (WALTER & CRAWFORD, 1997). Observa-se que a preferência na utilização de receptores de elétrons refere-se a diminuição do potencial de oxidação. Simplificadamente, pode-se dizer que o oxigênio tem preferência, seguido de nitrato, ferro, sulfato e, por fim, dióxido de carbono. A reação de biodegradação aeróbia do etanol requer alta demanda de oxigênio, o que faz com que ambientes com este contaminante tornem-se rapidamente anaeróbios, dificultando a degradação total devido a lentidão do processo (GRADY *et al.*, 1999). Como o etanol é preferencialmente degradado pelas bactérias, quando em derramamentos simultâneos a gasolina, a lentidão da degradação do etanol irá influenciar negativamente na degradação dos compostos tóxicos da gasolina (BTEX), que sofrerão retardo na sua degradação.

As bactérias aeróbias, de modo geral, podem mineralizar etanol transformando-o em CO₂ e H₂O no Ciclo de Krebs. O etanol é primeiramente oxidado em acetaldeído pela enzima Álcool desidrogenase. O acetaldeído é convertido diretamente em acetil-CoA pela enzima acetil acetaldeído desidrogenase ou em acetato pela acetaldeído desidrogenase e depois em acetil-CoA

pela acetato-CoA ligase. O acetil-CoA é oxidado em CO₂ no Ciclo de Krebs. (Powers *et al.*, 2001).

As bactérias podem ser classificadas considerando vários critérios, uma característica importante é o tipo de receptor de elétron utilizado. Exemplos de bactérias que usam o oxigênio com receptor final de eletrons são *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* (GRADY *et al.*, 1999).

3.3. Biodegradação anaeróbia

O processo anaeróbio baseia-se na utilização de microrganismos na ausência de oxigênio livre, para a degradação da matéria orgânica. Esta degradação refere-se às reações que reduzem as dimensões de partículas, tornando-as solúveis ou, a nível molecular, quebram cadeias, ligações triplas ou duplas existentes. Os produtos finais do processo anaeróbio são metano e compostos inorgânicos, incluindo o dióxido de carbono e amônia (McCARTY, 1982, GRADY *et al.*, 1999). O etanol está presente naturalmente na cadeia anaeróbia, pois os microrganismos fermentadores produzem álcoois, além de ácidos orgânicos, H₂ e CO₂ em suas reações. Outros membros do consórcio oxidam estes em acetato, H₂ e CO₂ que, finalmente, são transformados em CH₄ e CO₂ pelos metanogênicos (POWERS *et al.* 2001).

As condições anaeróbias são as que mais representam os casos reais de derramamentos de gasolina com etanol. Isto ocorre em função da grande demanda de receptores de elétrons ocasionada pela degradação do etanol em ambientes subsuperficiais. Após o consumo do oxigênio dissolvido, microrganismos anaeróbicos começam a se sobressair nas atividades de degradação, utilizando como receptores de elétrons o nitrato, o íon férrico o sulfato e o dióxido de carbono na respectiva ordem, conforme seus potenciais de oxi-redução e disponibilidade dos receptores (CHO *et al.*, 1997; LIBELO *et al.*, 1997, ALEXANDER, 1994). Em águas subterrâneas contaminadas com gasolina ou óleo, o O₂ dissolvido na água é rapidamente consumido e conseqüentemente a degradação torna-se extremamente lenta ou pode não ocorrer. Porém, a biodegradação de muitos compostos orgânicos é independente do suporte de O₂ e os processos anaeróbios são muito comuns. Além disso, alguns compostos persistem em condições aeróbias e desaparecem em condições anaeróbias (ALEXANDER, 1994).

Genericamente, quando vários receptores de elétrons se encontram disponíveis no meio, o sistema utiliza aquele que produz a mais alta quantidade de energia. Por esta razão, o oxigênio

dissolvido é utilizado primeiramente e, após a sua exaustão, o sistema deixa de ser aeróbio. Caso haja nitratos disponíveis, microorganismos específicos passam a utilizar o nitrato na respiração, convertendo-o a nitrogênio gasoso (desnitrificação). Esta condição recebe o nome específico de anóxica (ausência de oxigênio dissolvido, mas presença de nitratos). Quando estes se extinguem, tem-se as condições anaeróbias estritas. Nestas são utilizados os sulfatos, os quais são reduzidos a sulfetos, e em dióxido de carbono, que é convertido a metano. Enquanto houver substâncias de maior liberação de energia, as inferiores não serão utilizadas (ARCEIVALA, 1981).

De uma maneira simplificada, a sequência de transformações que ocorrem são função do receptor de elétrons e do estado de oxidação do composto, medido pelo seu potencial de oxirredução (expresso em mV). O estado de oxidação do composto determina a quantidade de energia máxima disponível através dele. Quanto mais reduzido for o composto, mais energia ele contém. O objetivo do metabolismo energético é conservar tanta energia quanto possível numa forma disponível para a célula. A energia máxima disponível por meio da oxidação de um substrato é a diferença entre o seu conteúdo energético (dado pelo seu estado de oxidação) e o conteúdo energético dos produtos finais da reação (também dado pelo seu estado de oxidação final da reação) (GRADY & LIM, 1980). Nesse sentido, tem-se os seguintes pontos:

- Quanto maior o estado de oxidação do produto final, maior a liberação de energia. O carbono no CO_2 encontra-se no seu mais elevado estado de oxidação. Portanto, reações que oxidam o carbono do substrato completamente a CO_2 (respiração aeróbia) liberam mais energia que reações que produzem, por exemplo, etanol (fermentação).
- Quanto menor o estado de oxidação do substrato, maior a liberação de energia. Por exemplo, a oxidação do ácido acético a CO_2 libera menor energia que a oxidação do etanol a CO_2 , pelo fato do carbono no ácido acético encontrar-se num estado de oxidação mais elevado do que o etanol.
- O CO_2 nunca pode servir como fonte de energia, pelo fato do seu carbono encontrar-se no mais elevado estado de oxidação possível (o CO_2 não pode ser oxidado).

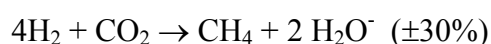
Simplificadamente, o processo anaeróbio inicia-se com a solubilização da matéria orgânica insolúvel e, mais especificamente para o etanol, a redução das macromoléculas

orgânicas solúveis (etapa 1, fig. 1). As reações responsáveis são geralmente hidrolíticas e catalisadas por enzimas extracelulares produzidas por bactérias, tais como celulasas, amilases e proteases. Durante o processo anaeróbio, ocorrem reações de hidrólise, de oxidação e de redução. As reações de oxidação liberam energia, que é utilizada para as demais reações envolvidas (GRADY *et al.*, 1999).

A acidogênese é a segunda etapa (fig. 1) do processo anaeróbio. Nesta, aminoácidos e açúcares, obtidos pela hidrólise, são degradados por reações fermentativas obtendo-se hidrogênio e ácidos propiônico, butírico, acético e similares. A produção de hidrogênio pela fermentação (etapa 2, fig. 1) é pequena e, em contraste, a maior parte provem da oxidação anaeróbia de ácidos voláteis graxos de cadeia longa (etapa 3 e 4, fig. 1) (GRADY & LIM, 1980; GRADY *et al.*, 1999).

Os produtos da reação de acidogênese, ácido acético e hidrogênio, são usados pelas bactérias metanogênicas visando à produção de gás metano (etapa 6 e 7, fig. 1). Duas culturas de células são envolvidas no processo. Uma reduz o dióxido de carbono em presença de hidrogênio e metano e a outra converte o ácido acético em metano e dióxido de carbono. Como mostrado na reação 5 (fig. 1), um pouco do hidrogênio pode ser combinado com dióxido de carbono para formar ácido acético (GRADY *et al.*, 1999).

A etapa da metanogênese pode ocorrer por dois caminhos. O primeiro, por produção de metano a partir de hidrogênio (etapa 7, fig. 1), na qual o dióxido de carbono atua como receptor de elétrons, sendo reduzido a metano. Esta via é responsável por menor parte das conversões, porém pode ser realizado por praticamente todas as bactérias metanogênicas. A segunda via, é a da produção do metano a partir do acetato (etapa 6, fig. 1), em que o carbono orgânico, na forma de acetato (ácido acético) é convertido a metano. Já esta via é mais importante em termos de conversões, embora seja realizada por poucas espécies de bactérias (LUBBERDING, 1995):



Nenhum dos metabólitos ou produtos produzidos na biodegradação é tóxico (acetaldeído; acetato; ácido butírico; ácido propiônico; gás hidrogênio; n-propanol; acetona; dióxido de carbono e metano), mas a produção e acumulação de Ácidos Graxos Voláteis como ácido

propiónico e butírico diminui o pH, o que pode inibir algumas populações de microorganismos, principalmente os metanogênicos, a porção mais frágil do consórcio anaeróbico, com exceção do acetaldeído que é mutagênico (POWERS *et al.*, 2001).

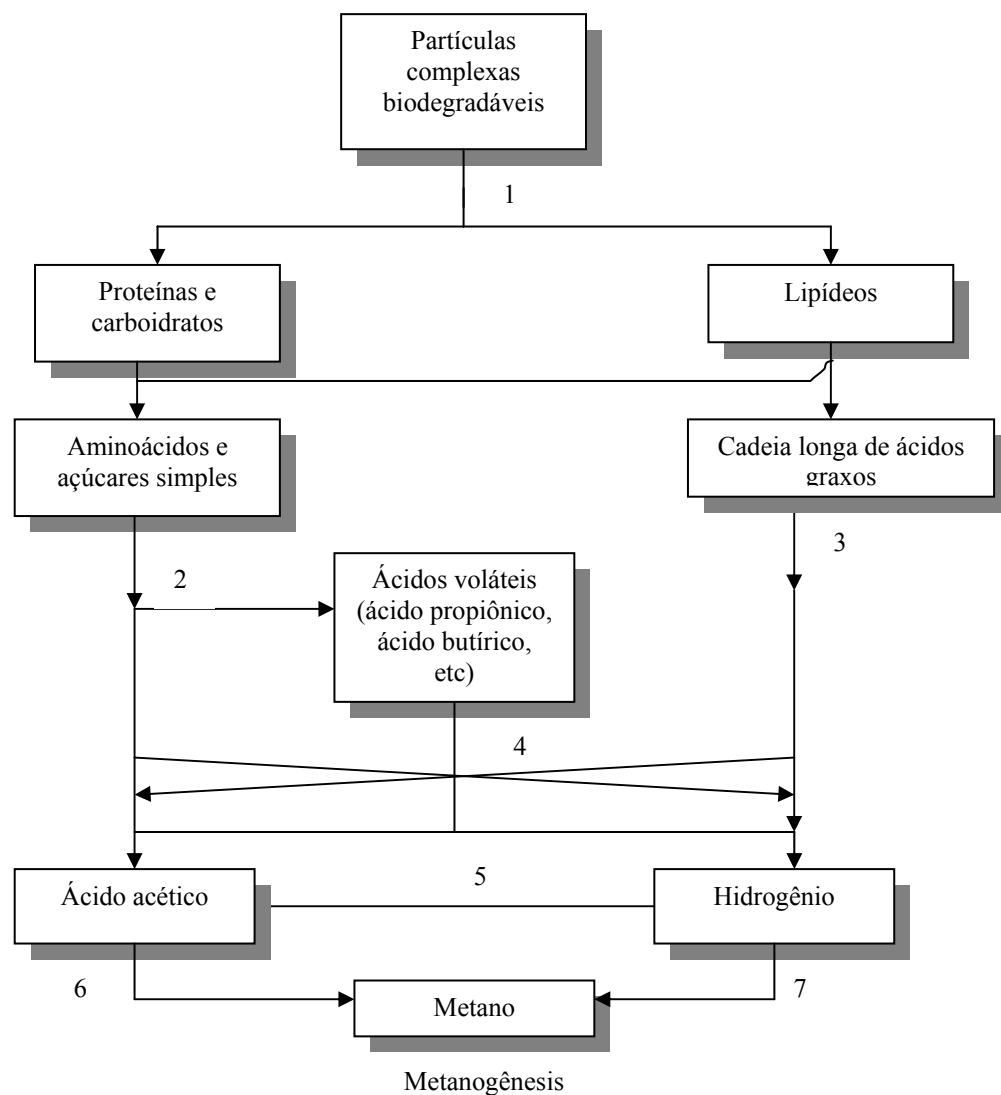


Figura 1 – Passos naturais do processo anaeróbico (fonte: GRADY *et al.*, 1999)

O número de espécies de microorganismos que coexistem em sistemas anaeróbios é muito grande. Vários autores que pesquisam sobre o potencial de degradação de bactérias anaeróbicas à compostos orgânicos evidenciam sua versatilidade metabólica (BATTERSBY & WILSON, 1989; AECKERSBERG *et al.*, 1991; CALDWELL *et al.*, 1998). Os principais microorganismos empregados no processo anaeróbio são as bactérias. A capacidade de uma bactéria anaeróbia

decompor um determinado substrato é específica, dependendo principalmente das enzimas que possui (as enzimas responsáveis pelas reações do processo de decomposição apresentam alto grau de especificidade) (PELCZAR *et al.*, 1980).

3.4. Fontes de energia e carbono para as células microbianas

As bactérias se caracterizam por seu crescimento rápido, sua versatilidade metabólica, plasticidade genética e capacidade de adaptação rápida as variações ambientais. Como todos seres vivos, as células bacterianas necessitam basicamente de energia, carbono e nutrientes (nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, etc). De uma maneira simplificada, os microorganismos crescem e se reproduzem às custas da energia liberada por meio da degradação do substrato (catabolismo). A energia armazenada em forma química nos compostos orgânicos (substratos) é liberada, sendo convertida a formação do material celular (anabolismo). Dois tipos de catabolismo foram enfocados nesse trabalho, o catabolismo oxidativo (oxidação da matéria orgânica) e o catabolismo fermentativo (fermentação da matéria orgânica). No catabolismo oxidativo, ocorrem reações redox, na qual a matéria orgânica é oxidada por um agente oxidante (oxigênio, nitrato ou sulfato). Já no catabolismo fermentativo não há um oxidante, o processo ocorre devido ao rearranjo dos elétrons na molécula fermentada, de modo que são formados no mínimo dois produtos (VON SPERLING, 1996, GRADY *et al.*, 1999).

3.5. Requisitos nutricionais

Os microorganismos retiram do meio ambiente todas as substâncias necessárias para a síntese de material celular e de obtenção de energia. As necessidades nutricionais dos microorganismos variam muito. Organismos autotróficos podem sintetizar todos os metabólitos necessários pela célula a partir de compostos inorgânicos; os heterotróficos requerem um ou mais nutrientes orgânicos. Essas diferenças nutricionais refletem diferenças na habilidade de síntese dos microorganismos. A habilidade em usar diferentes compostos como fonte de energia e de sintetizar proteínas e compostos do citoplasma a partir de compostos inorgânicos depende da presença de uma série de enzimas, sem as quais as células tornam-se mais exigentes nutricionalmente. A formação dessas enzimas é diretamente controlada pela genética da célula.

A falta ou a repressão de um ou mais genes que codificam a formação de uma destas enzimas reflete-se diretamente nas necessidades nutricionais da célula (METCALF & EDDY, 1991).

Aproximadamente 80% da célula bacteriana é composta de água que é essencial para a absorção dos nutrientes e remoção de produtos indesejáveis. Os 20% restante na célula são matéria seca. Desta matéria seca, em torno de 90% é orgânica e 10% é inorgânica. Fórmulas amplamente utilizadas para caracterizar a fração orgânica das células bacterianas são (METCALF & EDDY, 1991, GRADY *et al.*, 1999):

$C_5H_7O_2N$(sem incluir o fósforo)

$C_{60}H_{87}O_{23}N_{12}P$(incluindo o fósforo)

Em qualquer uma das formulações, a relação C:H:O:N é a mesma. Um aspecto importante é de que todos estes constituintes do material celular devem ser obtidos do meio, e a falta de algum deles pode limitar o crescimento da bactéria. Além da água, as principais substâncias que devem estar contidas no meio são (PELCZAR *et al.*, 1996):

- **Carbono:** representa de 45 a 50% do peso seco celular (TORTORA *et al.*, 2000). É o componente básico para a biossíntese, fazendo parte de todos os compostos sintetizados pela célula. Geralmente a mesma fonte de carbono serve como fonte de energia. As fontes de carbono mais comuns são os açúcares e os glicídios (pentoses, hexoses, polissacarídeos). Outras fontes de carbono menos comuns abrangem uma ampla faixa de compostos, indo desde às mais simples como metano e metanol, às mais complexas celulose e hemicelulose (METCALF & EDDY, 1991).
- **Nitrogênio:** consiste de 10 a 15% do peso seco das células. É o componente básico na formação de aminoácidos que formam as proteínas. É assimilado sob forma amoniacal. Fontes de nitrogênio em outras formas que não a amoniacal são primeiro transformadas em íons amônio dentro da célula (CARMOUZE, 1994). Ao contrário das células eucarióticas, algumas bactérias podem utilizar nitrogênio atmosférico para a síntese celular (fixação de nitrogênio). Porém, nem todas as espécies são capazes de

realizar este processo (PELCZAR *et al.*, 1996). Muitas substâncias servem como fonte de nitrogênio (ALEXANDRER, 1994):

- a) fontes inorgânicas de nitrogênio: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , N_2 , etc.
- b) fontes orgânicas de nitrogênio: aminoácidos e hidrolizados de proteínas naturais, peptídeos, uréia, purinas e pirimidinas.

O nitrato é a forma oxidada mais estável do nitrogênio em solução aquosa. É regenerado por via bacteriana (nitrificação) a partir do nitrogênio orgânico. A produção de nitrato resulta da oxidação bacteriana do amônio, tendo o NO_2^- como intermediário.

O nitrogênio é considerado um macronutriente (nutriente necessário em grandes quantidades) além de ser nutriente limitante para o crescimento da comunidade microbiana.

- **Fósforo:** em águas naturais, o fósforo encontra-se predominantemente na forma de fosfatos em solução (orto, ou íons do ácido ortofosfato), em partículas ou detritos (fósforo particulado orgânico ou inorgânico). Pode também estar incorporado à estrutura de organismos aquáticos (BAUMGARTEN & POZZA, 2001). É assimilado somente na forma de di-hidrogênio fosfato (ortofosfato) H_2PO_4 . É importante na regulação do metabolismo celular, a síntese de ácidos nucleicos, fosfolipídeos da membrana celular e no fornecimento de fosfatos para a geração de energia (ATP) (PELCZAR *et al.*, 1996). A concentração intracelular de PO_4^{3-} regula a síntese de lipídeos e carboidratos (ALEXANDER, 1994). Geralmente este nutriente é pouco abundante na maioria dos ambientes por não ser abundante na crosta terrestre e não existir na forma gasosa e pela sua tendência a adsorção à partículas do sedimento. Por outro lado, muitas atividades humanas resultam em aumento nos níveis de fósforo nos ambientes, como o uso de fertilizantes na agricultura.
- **Enxofre:** Representa 1 a 2% do peso seco celular e entra na constituição dos aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína. As fontes inorgânicas de enxofre são tipicamente K_2SO_4 ou mais comumente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A formação de pontes de

dissulfeto é importante para a atividade de proteínas. O enxofre é encontrado em certas vitaminas tais como biotina e tiamina (PELCZAR *et al.*, 1996).

➤ **Elementos minerais:** são necessários em concentrações da ordem de miligramas por litro. Dentre os minerais destacam-se (PELCZAR *et al.*, 1996):

➤ **Potássio:** apresenta as seguintes funções:

- a) regulador da pressão osmótica (para cada íon metálico divalente absorvido, o dobro da quantidade de K^+ é excretada);
- b) estimula a fermentação e respiração em pH reduzido;
- c) é o co-fator de várias enzimas.

➤ **Magnésio:** é o co-fator de várias enzimas. Participa na ativação das enzimas glicolíticas, estimula a síntese de ácidos graxos essenciais, regula os níveis iônicos celulares, a ativação de ATPases na membrana e a absorção de fosfato juntamente com K^+ . A concentração de Mg^{++} afeta a associação dos ribossomos.

➤ **Cálcio:** estimula o crescimento celular pela incorporação na parede celular e membrana plasmática.

➤ **Ferro:** é necessário para a síntese dos citocromos e de certos pigmentos.

Na literatura, são encontrados outros íons como Cl^- , Na^+ , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , CO^{2+} na composição elementar de muitos microorganismos e estão envolvidos em importantes etapas do metabolismo.

Na prática a taxa do crescimento da vida aquática é determinada pela disponibilidade de nitrogênio ou de fósforo. A disponibilidade desses nutrientes irá depender das características da água e do solo.

Foram encontrados uma ampla gama de relações C:N:P (carbono: nitrogênio: fósforo) na literatura. Paul e Clark (1989) cita a concentração 30:5:1. Já Alexander (1994) calcula a relação 40:7,2:1 e Metcalf & Eddy (1991) 60:12:1.

Segundo Alexander (1994), para o crescimento de bactérias heterotróficas e fungos, são necessários, além dos compostos orgânicos que servem como fonte de carbono e energia e receptores de elétrons, um grupo de elementos nutrientes. Os nutrientes inorgânicos são necessários a todas as espécies. No caso de uma contaminação orgânica, os microorganismos

necessitarão de mais nutrientes e receptores de elétrons do que utilizavam naturalmente no meio ambiente.

3.6. Efeito do etanol no crescimento microbiano

Altas concentrações de etanol estão relacionadas ao alto consumo de oxigênio, deixando o sistema rapidamente anaeróbio, tornando os processos de biodegradação dos compostos BTEX extremamente lentos (LOVANH *et al.*, 2002). O que merece atenção especial é o derramamento de etanol em corpos de água potável usados para abastecimento público. Neste caso, o etanol puro torna-se perigoso pela sua grande mobilidade e difícil detecção imediata. Além disso, em altas concentrações o etanol não é degradado por tornar-se tóxico para os microorganismos (HUNT *et al.*, 1997). As concentrações acima de 40.000 mg/L são tóxicas (HUNT *et al.*, 1997). Outros experimentos mostraram que há atividade microbiana na presença de etanol na concentração de 100.000 mg/L, mas não em 200.000 mg/L. Esta toxidez seria por desorganização da permeabilidade celular e os esporos apresentariam maior resistência a ela (POWERS *et al.*, 2001).

A toxicidade dos álcoois é relacionada à hidrofobicidade da molécula e ao tamanho de sua cadeia. Os maiores (por volta de 10 carbonos) apresentam maior atividade inibidora que os pequenos. Assim, o etanol (com 2 carbonos) teria baixa toxidez. Sabe-se também que o etanol não é mutagênico, porém o acetaldeído sim (POWERS *et al.*, 2001).

3.7. Curva de crescimento bacteriano

O termo crescimento bacteriano aplica-se ao aumento do número de microorganismos. O principal modo de reprodução das bactérias é por fissão binária, isto é, quando a célula atinge um determinado tamanho, divide-se em duas células, as quais irão posteriormente gerar quatro novas células, e assim por diante. Assim, após n divisões o número formado de células é 2^n . O tempo de geração bacteriano (tempo necessário para uma célula formar duas outras prontas para também se dividirem) varia entre os organismos e também depende das condições ambientais. Na maioria das espécies dura entre 1 e 3 horas, porém podem ocorrer em 24 horas ou em apenas 20 minutos. Assim, ao se inocular um volume de líquido com uma certa quantidade inicial de

células e uma quantidade limitada de substrato e nutriente, o número de bactérias progredirá segundo uma curva típica de crescimento bacteriano, expressa abaixo (TORTORA *et al.*, 2000):

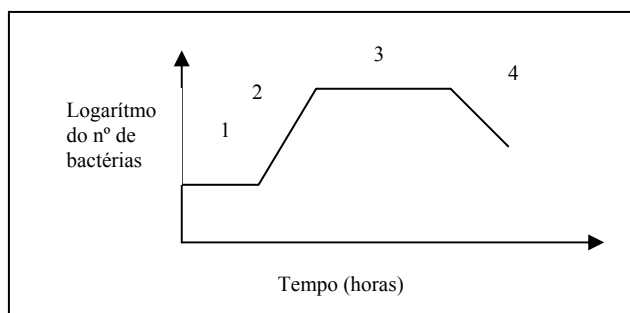


Figura 2 – Modelo de curva de crescimento: (1) Fase de aclimação, (2) Fase exponencial, (3) Fase estacionária e (4) Fase de declínio. (**Fonte:** TORTORA *et al.*, 2000).

- (1) **Fase de aclimação:** (LAG) esta fase é um período de adaptação enzimática e não ocorre aumento do número de microrganismos. Na fase de aclimação ou fase “lag” a concentração dos microrganismos permanece constante, entendendo-se que o microrganismo está rearranjando seu sistema enzimático, a fim de dar início à metabolização do substrato proposto. Esta fase, não apresenta interesse do ponto de vista prático, pois tem sua duração dependente do meio e condições de cultivo empregadas para o preparo do inóculo. Desta forma, quanto mais aclimatado estiver o microrganismo, às condições de cultivo que se pretende impor, menor será o tempo de duração desta fase (PELCZAR, 1996, TORTORA *et al.*, 2000).
- (1-2) **Fase de aceleração:** (LOG) nesta fase inicia-se o crescimento microbiano, inicia o consumo de substrato. A velocidade de crescimento aumenta com o tempo (TORTORA *et al.*, 2000).
- (2) **Fase exponencial:** frente às condições adequadas de vida (substrato abundante). Os microrganismos crescem em velocidade máxima. Também chamada fase log. Neste as células se dividem numa taxa logarítmica constante, pois há excesso de substrato no meio. Nesta fase os microrganismos são particularmente sensíveis a mudanças ambientais. (TORTORA *et al.*, 2000).

- (2-3) **Fase de desaceleração:** a velocidade de crescimento passa a diminuir, uma vez que o substrato disponível começa a ficar escasso ou ainda pode ocorrer um acúmulo mais intenso de produtos que interfiram negativamente no crescimento (TORTORA *et al.*, 2000).
- (3) **Fase estacionária:** a velocidade de crescimento dos microrganismos volta a ser nula, devido ao esgotamento dos substratos ou ao acúmulo de substâncias tóxicas em níveis incompatíveis ao microorganismo (TORTORA *et al.*, 2000). A população permanece constante por este período como resultado da completa cessação das divisões binárias ou por equilíbrio entre a taxa de reprodução e de mortalidade. (PELCZAR, 1996).
- (4) **Fase de declínio:** ocorre a diminuição do número de microrganismos (velocidade de crescimento negativa) causada pela sua morte. A redução da concentração celular pode ser em virtude do consumo das reservas alimentares intracelulares, ou mesmo em virtude de lise celular, com a consequente redução do número de células presentes. Vários fatores podem contribuir para a mortalidade bacteriana, mas os principais são falta de nutrientes essenciais e acúmulo de substâncias inibidoras (como ácidos) (VON SPERLING, 1996, TORTORA *et al.*, 2000).

3.8. Determinação da biomassa

As bactérias constituem 90-95% do metabolismo heterotrófico do solo (PETERSEN & LUXTON, 1982). A biomassa de uma população bacteriana tem sido reconhecida como importante parâmetro em relação à ecologia microbiana, cinética e estimativas de taxas respiratórias ou energéticas. A contagem destes microrganismos é frequentemente requerida quando se deseja estimar a produtividade de um sistema, a produção da biomassa ou o potencial de utilização do substrato.

Várias técnicas tem sido utilizadas para se determinar a biomassa bacteriana em ecossistemas naturais. Atualmente a técnica que tem recebido considerável atenção considera a medida do biovolume celular bacteriano (volume por célula) para posteriormente conversão para biomassa celular como carbono por célula ou peso seco (BRATBAK, 1985). A biomassa é

obtida por vários métodos dependendo da amostra e do propósito do estudo. Técnicas comumente utilizadas provêm de estimativas do biovolume bacteriano através de observações microscópicas (NORLAND *et al.*, 1987). Dentre estas técnicas, a microscopia de epifluorescência, microscopia eletrônica, microscopia de transmissão de elétrons e analisadores eletrônicos de partículas tem sido utilizados.

Os microorganismos podem ser contados por observação direta em microscópio. Tendo essa estimativa do número celular, pode-se converter a biomassa (BYRD & COLWELL, 1992; COSTA, 1999). Células bacterianas podem ser facilmente distinguidas de outras partículas da amostra através das várias técnicas de microscopia. Na microscopia de epifluorescência (EPF), usam-se substâncias fluorescentes como o alaranjado de acridina para coloração direta das células, ou anticorpos fluorescentes que se ligam às células, permitindo sua observação (COSTA, 1999). Com o uso do corante alaranjado de acridina, as células viáveis fluorescem de laranja, isto é, a fluorescência ocorre apenas em células ativas, isso porque ela é gerada depois da clivagem enzimática da molécula. No entanto, células mortas também podem produzir fluorescência já que as mesmas podem apresentar atividade enzimática, como a liberação das esterases (ATLAS & BARTHA, 1946). Essa é uma desvantagem dessa metodologia, isto é, não pode-se distinguir microorganismos vivos, mortos ou dormentes. (KING & PARKER, 1988). A utilização deste corante, possibilita uma contagem precisa, discriminando possíveis erros cometidos pela interferência de outras partículas, porque liga-se a moléculas de RNA ou DNA. A contagem celular através da microscopia direta tem se tornado popular devido a que muitas comunidades bacterianas que ocorrem na natureza, não podem ser estimadas através da contagem das colônias sobre vários meios de cultura em placa.

A medida ideal para determinação de biomassa, devido a complexidade do sistema enzimático dos microorganismos, conforme postulado por alguns autores, seria a quantificação dos complexos enzimáticos presentes, bem como suas atividades, em um dado instante, o que trata-se de uma tarefa inviável, contando-se com os conceitos e as metodologias analíticas disponíveis.

3.9. Cinética de degradação

Efetuar o estudo cinético de um dado fenômeno ou processo, significa estudar a evolução no tempo deste processo, através da quantificação de certas grandezas que definem adequadamente esta evolução. Informações sobre a cinética de degradação de compostos químicos são de extrema importância porque possibilitam estimar a persistência dos contaminantes no ambiente, predizer suas concentrações em um dado tempo de modo a determinar a possibilidade de completa degradação destes compostos, antes que atinjam sítios de exposição aos organismos.

Os estudos de cinética podem ser enfocados no padrão de decomposição do microrganismo em estudos de microcosmos e avaliação dos fatores que afetam a biodegradação, como concentração dos contaminantes, a biomassa ativa, biodisponibilidade, temperatura, pH, nutrientes, receptores de elétrons, existência de inibidores, entre outros. Normalmente efetua-se a medida da concentração de microorganismos (X) presentes, a concentração do substrato (S) que limita o processo e a concentração do produto (P) no qual possa estar interessado, enquanto processo produtivo.

Primeiramente, faz-se o balanço de massa das espécies químicas e biológicas presentes no meio de cultura, que pode ser expresso através de um balanço de conservação de espécie química ou biológica segundo a equação abaixo.

$$\{\text{Acúmulo}\} = \{\text{Entrada}\} - \{\text{Saída}\} + \{\text{Gerado}\} - \{\text{Consumo}\} \quad (1)$$

Balanço de massa para o substrato

Quando o reator estudado é um reator em batelada, os termos de entrada e saída da espécie química são considerados nulos. O balanço de massa para o substrato pode ser representado segundo a equação abaixo:

$$\{\text{Entrada}\} = \{\text{Gerado}\} = 0 \quad (2)$$

Pois o substrato não gera nada, assim a equação 1 fica no formato:

$$\{\text{Acúmulo}\} = \{\text{Consumo}\} \quad (3)$$

Assim, para o substrato, expressando-o como a variação temporal da massa de substrato com a massa de substrato em relação ao tempo, e o consumo como uma taxa instantânea, a equação 3 pode ser re-escrita como:

$$\text{onde,} \quad \frac{d(V.X)}{dt} = 0 - 0 + V.r_s \quad (4)$$

V= volume

S= Concentração de substrato

rs= taxa instantânea de consumo de substrato

Dispondo de um conjunto de dados experimentais de concentração de microorganismos presentes, a concentração do substrato que limita o processo e a concentração do produto em função do tempo, podem-se determinar as velocidades de crescimento (r_x), consumo de substrato (r_s) e formação do produto (r_p), através dos coeficientes angulares das tangentes às curvas (SAWYER & McCARTY, 1978, YANG & OKOS, 1987):

$$r_x = \frac{dX}{dt}; \quad (5)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt}; \quad (6)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (7)$$

Substituindo a velocidade de crescimento do substrato (r_s) na equação (4), tem-se:

$$\frac{d(V.X)}{dt} = V.\left(-\frac{dS}{dt}\right) \quad (8)$$

As velocidades específicas são, no entanto, função da quantidade de células presentes, ou seja, podem-se ter altos valores para r_x , r_s e r_p , em virtude de se ter no sistema altos valores de X, que é o responsável pelo fenômeno biológico. Por isso, o estado em que se encontram estas

células é melhor definido através do cálculo das velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e acúmulo do produto:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (9)$$

$$\mu_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (10)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (11)$$

A equação (8) pode ficar melhor representada em termos da velocidade específica. Para isso substitui-se $\left(-\frac{dS}{dt}\right)$ por $(X \cdot \mu_s)$ da equação (10), tomando a forma:

$$\frac{dSV}{dt} = -\mu_s XV \quad (12)$$

As velocidades específicas representam as velocidades definidas por unidade de concentração celular. Isto significa que estas velocidades específicas tem como dimensão $(\text{tempo})^{-1}$, desde que X, S e P estejam expressas em massa por volume.

Outra grandeza que se deve definir, por sua grande utilidade, é o fator de conversão substrato a células, chamado de coeficiente de produção celular (Y):

$$Y = \frac{X - X_o}{S_o - S} \quad (13)$$

onde,

X_o = concentração celular no instante inicial

S_o = concentração de substrato no instante inicial

X =concentração celular num instante t

S =concentração de substrato num instante t

Tal grandeza define a quantidade de células que surge $(X-X_o)$, em virtude do consumo de uma dada quantidade de substrato $(S-S_o)$, e pode ser reescrita como:

$$Y = \frac{dX}{(-dS)} - \frac{\frac{1}{X} \frac{dX}{dt}}{\frac{1}{X} \frac{(-dS)}{dt}} = \frac{\mu}{\mu_s} \quad (14)$$

Desde que as condições de um cultivo não sejam alteradas significativamente ao longo deste cultivo, entende-se que Y deve ser constante. Esta hipótese tem consequências imediatas. Uma delas reside na possibilidade de se calcular valores de X, a partir de um dado valor inicial, desde que se conheça o correspondente consumo do substrato, em um dado intervalo de tempo e, o valor a ser assumido para Y (SAWYER & McCARTY, 1978, YANG & OKOS, 1987):

Retornando a equação 13, pode-se reescrever a velocidade específica em função do coeficiente de produção celular (Y):

$$\mu_s = \frac{1}{Y} \cdot \mu \quad (15)$$

Para deixar a equação 12 em função do coeficiente de produção celular, substitui-se a variável μ_s da equação 15 e elimina-se o Volume de ambos os lados da equação, obtendo a forma:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-\mu X}{Y} \quad (16)$$

A segunda consequência do fato de considerar o Y constante, reside na relativa facilidade para a própria determinação de Y dispondo-se de dados experimentais de X e S, ao longo de um dado cultivo.

De fato, caso Y seja realmente constante, é possível plotar X em função de S, obtendo-se o valor de Y a partir do coeficiente angular da reta obtida (SAWYER & McCARTY, 1978, YANG & OKOS, 1987):

$$Y_s = \frac{dX}{(-dS)} \quad \Rightarrow \quad Y = \frac{dX}{dS} = \frac{X_t - X_o}{S_o - S_t}$$

ou

$$X = X_o + Y \cdot S_o - YS \quad (17)$$

Colocando a equação 16 em função da concentração celular (X) da equação 17 obtém-se a nova equação:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-\mu[X_0 + Y(S_0 + S)]}{Y} \quad (18)$$

Ao contrário das reações químicas comuns, para as quais a definição das concentrações de reagentes e produtos determina adequadamente a situação do processo, em um fenômeno biológico o agente ativo, que promove as alterações que se observam, é o microorganismo (ou microorganismos) presente. Este, por sua vez, age segundo seu sistema enzimático, o qual como se sabe, é constituído por milhares de enzimas. Estas enzimas são sintetizadas pelo próprio microorganismo, porém esta síntese é controlada pelas condições do meio externo (fenômenos de indução e repressão), assim como a ação das enzimas é também modulada (presença de inibidores e ativadores), o que confere ao sistema uma enorme complexidade.

A cinética das reações enzimáticas foi proposta por Michaelis-Menten. Como a decomposição bacteriana envolve uma série de reações catalizadas por enzimas, a expressão de Michaelis-Menten pode ser ampliada para descrever a cinética do crescimento bacteriano e as reações de decomposição (SAWER & MCCARTY, 1978). Se um microorganismo é inoculado em reatores contendo meio líquido, fatores de crescimento e nutrientes inorgânicos necessários para degradação de um certo composto químico, a taxa do crescimento destes organismos será diretamente proporcional a concentração do substrato disponível. Sem entrar em detalhes sobre as reações enzimáticas, apresenta-se diretamente a equação da taxa de reação do substrato. Esta segue uma forma hiperbólica em que a taxa tende a um valor de saturação (fig. 3).

Desta forma, quando se trata da cinética do crescimento bacteriano e da remoção do substrato, a equação de Michaelis-Menten é denominada cinética de Monod (1948). Essa é a cinética de crescimento mais frequentemente utilizada para descrever, experimentalmente, a biodegradação do substrato. Pode ser expressa matematicamente (ALEXANDER, 1994; ROBINSON & TIEDJE, 1983; McCARTY, 1972) como:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (19)$$

onde,

μ = é a velocidade específica de crescimento bacteriano num dado instante t (d^{-1})

μ_{\max} = taxa de crescimento máxima, que ocorre para altas concentrações de substrato (d^{-1})

S = concentração do substrato limitante no instante t (mg/L)

K = constante que representa a concentração do substrato para a qual a taxa de crescimento é a metade da taxa de crescimento máxima (constante de saturação) (mg/L)

Inserindo a equação de Monod (19), na equação (18) obtém-se:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-\mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} [X_0 + Y(S_0 + S)]}{Y} \quad (20)$$

Integrando a derivada acima tem-se:

$$\frac{YK_s}{YS_0 + X_0} \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) - \frac{(K_s Y + YS_0 + X_0)}{YS_0 + X_0} \ln\left(\frac{Y(S_0 - S) + X_0}{X_0}\right) = \mu_{\max} t$$

ou

$$C_1 \ln\left(\frac{Y(S_0 - S) + X_0}{X_0}\right) - C_2 \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = \mu_{\max} t \quad (21)$$

Onde:

$$C_1 = \frac{K_s Y + YS_0 + X_0}{YS_0 + X_0};$$

$$C_2 = \frac{YK_s}{YS_0 + X_0}$$

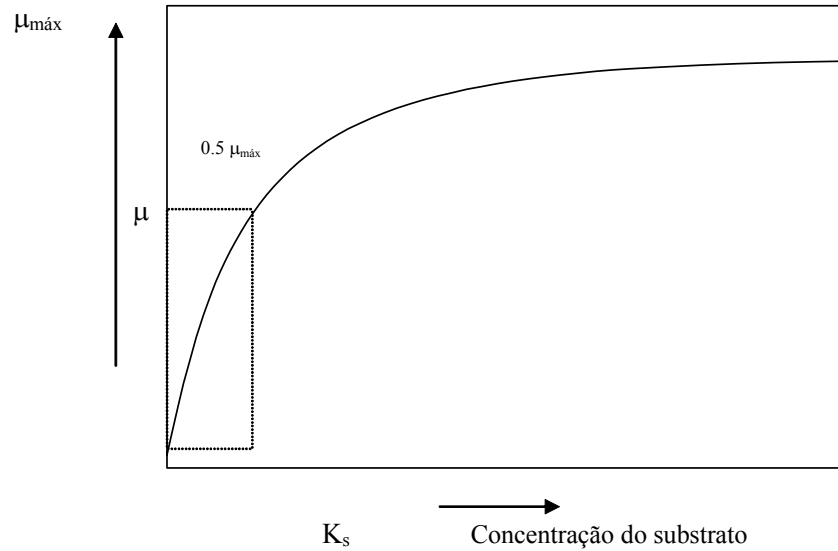


Figura 3. Representação gráfica da relação entre taxa de crescimento bacteriano e a concentração do substrato (C) como fonte de energia. (Fonte: ALEXANDER, 1994.)

O balanço de massa das espécies biológicas presentes no meio de cultura, pode ser expresso através de um balanço de conservação da biomassa segundo a equação abaixo:

$$\{\text{Acúmulo}\} = \{\text{Entrada}\} - \{\text{Saída}\} + \{\text{Gerado}\} - \{\text{Consumo}\} \quad (22)$$

Considerando a mesma hipótese assumida para o balanço do substrato, que o reator é um reator em batelada, os termos de entrada e saída da espécie química são nulos.

$$\{\text{Entrada}\} = \{\text{Gerado}\} = 0 \quad (23)$$

No processo biológico as células geram outras células assim o balanço de massa da equação 22 fica no formato:

$$\{\text{Acúmulo}\} = \{\text{Gerado}\} \quad (24)$$

Expressando o acúmulo de células como a variação temporal das células com a massa de substrato em relação ao tempo, e a geração de células como uma taxa instantânea, a equação 24 pode ser re-escrita como:

onde,

$$\frac{d(V.X)}{dt} = 0 - 0 + V.r_x \quad (25)$$

V= volume

S= Concentração de substrato

rx= taxa instantânea de crescimento celular

Substituindo a velocidade de crescimento das células (rx) da equação 5 na equação (25), tem-se:

$$\frac{d(V.X)}{dt} = V \cdot \left(\frac{dX}{dt} \right) \quad (26)$$

A equação (26) pode ficar melhor representada em termos da velocidade específica, para isso substitui-se $\left(\frac{dX}{dt} \right)$ por $(X \cdot \mu)$ da equação (9), tomando a forma:

$$\frac{dXV}{dt} = \mu XV \quad (27)$$

Substituindo na equação 27 a equação de Monod (19), obtém-se a seguinte equação:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} X \quad (28)$$

Integrando a equação (28), obtem-se a equação (29):

$$X = X_0 e^{\left(\mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \right) t} \quad (29)$$

Onde:

S: mg/L

X: mg/L

Y: mgcélula/mgsubstrato

Ks: mg/L

t: dias

As equações deduzidas 20 e 29 possibilitam encontrar os valores de K_s e μ_{\max} através de uma regressão não-linear. Os valores de K_s representam a afinidade do organismo em relação ao substrato, ou seja, quanto menor o valor de K_s , maior a afinidade do microorganismo em relação a molécula em questão. Valores de K_s podem variar para uma mesma espécie de bactéria quando vários substratos ou concentrações são analisadas (SIMKINS & ALEXANDER, 1984). Para decomposição aeróbica do substrato o valor de K_s geralmente é menor que 20 mg/L (McCARTY, 1972).

No início de uma reação de decomposição de substrato, quando a sua concentração é ainda elevada e não há limitação do mesmo no meio, a taxa de remoção global aproxima-se da cinética de ordem zero. Na medida em que o substrato passa a ser consumido, a taxa de reação começa a decrescer, caracterizando uma região de transição, ou de ordem mista. Quando a concentração de substrato passa a ser bem baixa, a taxa de reação passa a ser limitada pela pouca disponibilidade do mesmo no meio. Nestas condições, a cinética ocorre como em primeira ordem (McCARTY, 1972).

Estas duas situações ocorrem em função dos valores relativos de S e K_s . Assim se S é muito maior que constante de meia-velocidade K_s , a reação segue uma cinética de ordem zero, em que a taxa de reação é independente da concentração do substrato. A curva de degradação do substrato segue uma cinética logarítmica (figura 4), onde a maior parte do substrato irá desaparecer, enquanto os sistemas metabólicos celulares são saturados (SIMKINS & ALEXANDER, 1984). Já se a concentração do substrato for muito menor que o valor de K_s , a taxa de reação é proporcional à concentração de substrato presente.

Quando a disponibilidade de matéria orgânica é suficiente há uma estreita relação entre a concentração do substrato e o número de bactérias; as bactérias estão em fase de crescimento e quando o substrato apresenta-se em baixa concentração, a taxa de crescimento é proporcionalmente reduzida. Organismos capazes de crescerem sob altas concentrações de substrato, tipicamente crescem menos para baixas concentrações, provavelmente por baixa afinidade ao substrato (alto K_s). Alternativamente, organismos que crescem eficientemente em baixas concentrações de substrato, geralmente exibem baixas taxas de crescimento para altas concentrações do substrato (baixo K_s) (KLECKA & MAIER, 1985).

A cinética logarítmica de degradação do substrato pode ser escrita como (figura 4):

$$dS/dt = \mu_{\max}(S_0 + X_0 - S) \quad (30)$$

que integrando resulta em:

$$S = S_0 + X_0[1 - \exp(-\mu_{\max}t)] \quad (31)$$

onde S_0 é a concentração inicial de substrato, S é a concentração de substrato no tempo t e X_0 é a quantidade de substrato necessária para produzir a população microbiana inicial (ALEXANDER, 1994).

Quando a concentração inicial de substrato é muito inferior a K_s ($S_0 \ll K_s$), a taxa de crescimento diminui progressivamente, ou ainda, a taxa de crescimento microbiano torna-se proporcional a concentração do substrato (SIMIKINS & ALEXANDER, 1984). O número de bactérias continua a crescer mesmo para baixas concentrações de substrato, porém, o período entre cada divisão celular torna-se progressivamente maior. O modelo logístico simula este tipo de cinética e está representado na Figura 4.

A cinética logística para degradação do substrato pode ser escrita como:

$$-dS/dt = dS(S_0 + X_0 - S) \quad (32)$$

que integrando resulta em:

$$S = S_0 + X_0 / [1 + (X_0/S_0) \exp[k(S_0 + X_0)t]] \quad (33)$$

onde $k = \mu_{\max}/K_s$.

Quando a concentração inicial do substrato é aproximadamente a mesma que K_s , ($S_0 \sim K_s$), a situação é mais complexa porque μ não é diretamente dependente da concentração inicial

do substrato, mas permite o crescimento microbiano (Figura 4). A curva de Monod com crescimento, é apresentada na Figura 4 . Matematicamente esta curva pode ser escrita como:

$$-dS/dt = \mu_{\text{máx}} S(S_0 + X_0 - S)/K_s + S \quad (34)$$

ou por integração em:

$$K_s \ln (S/S_0) = (S_0 + X_0 + K_s) \ln (X/X_0) - (S_0 + X_0)\mu_{\text{máx}}t \quad (35)$$

onde X é a quantidade de substrato necessária para a produção da população. O metabolismo de benzoato por cultura de bactérias da espécie *Pseudomonas sp* para concentrações deste composto próximas a K_s , demonstraram seguir a cinética de Monod com crescimento (SIMKINS & ALEXANDER, 1984).

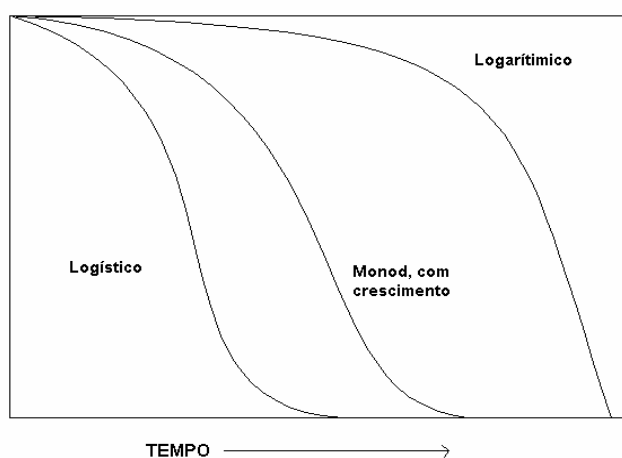


Figura 4. Curvas de degradação para substratos que são metabolizados por diferentes tipos de cinética. **Fonte:** ALEXANDER, 1994.

Para os três modelos apresentados, as células estão se multiplicando em função do substrato químico no qual a biodegradação está sendo determinada, embora os microorganismos

possam estar crescendo sobre outras fontes de carbono presentes. Neste caso, um dos compostos que está servindo de suporte para o crescimento celular, poderá estar reprimindo o metabolismo de outro substrato (ALEXANDER, 1994)

A cinética de degradação dos compostos orgânicos é alterada pela presença de outros substratos nos quais os microorganismos podem utilizar simultaneamente. Quando dois substratos são metabolizados ao mesmo tempo, a degradação do composto que está presente em baixas concentrações, pode ser otimizada se a população está crescendo na presença do outro composto. Pode-se prever que os microorganismos obtêm 50% mais energia da oxidação da molécula do etanol do que em relação aos compostos BTEX quando presentes no meio (CORSEUIL *et al.*, 1998). As reações metabólicas envolvidas na degradação de um determinado substrato, para obtenção de energia e multiplicação celular, são reações de oxi-redução e envolvem, portanto, a transferência de elétrons entre um substrato e um receptor de elétrons (oxigênio, nitrato, íon férrico, sulfato, etc) (CORSEUIL, 1997).

O modelo de Monod é um modelo denominado fenomenológico pois é baseado em fenômenos físicos, químicos e biológicos do processo. Seu equacionamento fundamenta-se na formulação de balanços de massa e energia. É importante salientar que as equações de balanço de massa apresentam dependência com o tempo ao contrário da equação de Monod. Portanto, deve-se ter precaução na sua utilização em estados transientes, que podem apresentar tempos de resposta lentos para a taxa de crescimento específica em relação a mudanças na concentração do substrato.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta dissertação de mestrado é parte de um estudo multidisciplinar, sobre a cinética de degradação do etanol em condições aeróbicas e anaeróbicas em condições limitantes de nitrogênio e fósforo, envolvendo dois trabalhos de conclusão de curso. As atividades experimentais foram desenvolvidas conjuntamente por uma aluna de mestrado em Engenharia Ambiental (Bianca Alves Dias Martins), uma aluna de graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental (Marcela de Oliveira) e uma aluna de graduação em ciências biológicas (Madalena Heinen).

4.1. Microcosmos - experimento aeróbio

Os experimentos de biodegradação aeróbia do etanol foram realizados em microcosmos, sendo todos tratamentos em triplicata, e com repetições suficientes para 9 medidas, totalizando 108 microcosmos. Todo material utilizado no experimento foi previamente autoclavado 120°C e 1 atm, por 20 minutos. O experimento foi montado dentro de uma capela de fluxo laminar (figura 5), previamente desinfetada com luz ultra-violeta, para evitar o máximo possível a contaminação com microorganismos do ar. Como microcosmos, foram utilizados frascos de penicilina de 100 mL. Foram feitos 4 tratamentos, onde a concentração ideal mínima de nutriente foi escolhida com base no modelo termodinâmico de McCarty (1969), explicada no item 4.5, sendo:

Tratamento 1 – 20 % da concentração ideal mínima de nutriente

- 1 mL do inóculo celular com microorganismos do solo de um aquífero não contaminado;
- 1 mL de etanol, obtendo a concentração inicial no microcosmo de 112,32 mg/L;
- 2 mL da solução nutriente (modo de preparo: item 4.5.1);
- 8 mL de água deionizada autoclavada.

Tratamento 2 – 100 % da concentração ideal mínima de nutriente

- 1 mL do inóculo celular com microorganismos do solo de um aquífero não contaminado;
- 1 mL de etanol, obtendo a concentração inicial no microcosmo de 112,32 mg/L;
- 10 mL da solução nutriente (modo de preparo: item 4.5.1).

Tratamento 3- Sem adição de nutriente

- 1 mL do inóculo celular com microorganismos do solo de um aquífero não contaminado;
- 1 mL de etanol, obtendo a concentração inicial no microcosmo de 112,32 mg/L;
- 10 mL de água deionizada autoclavada.

Tratamento 4 – controle da atividade biológica

- 1 mL do inóculo celular com microorganismos do solo de um aquífero não contaminado;
- 1 mL de etanol, obtendo a concentração inicial no microcosmo de 112,32 mg/L;
- 10 mL da solução nutriente (modo de preparo: item 4.5.1);
- 0,036g de azida (NaN_3) na concentração de 3g/L, para esterilizar o microcosmo.



Figura 5- Câmara laminar para montagem do experimento

O etanol utilizado na montagem do experimento foi da J. T. Baker (HPLC/UV). Depois de todos microcosmos lacrados hermeticamente com septos de borracha 0,8 mm e 20 mm de diâmetro (Mod. HP), revestidos com teflon, e com lacres de alumínio (Mod. HP), os mesmos foram armazenados com ausência de luz em uma caixa de isopor, contendo um termômetro de bulbo de mercúrio, onde a temperatura manteve-se a $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Para garantir que o microcosmo se manteria aeróbio durante o período do experimento, primeiramente foi estimada essa concentração necessária por relação estequiométrica do etanol e do oxigênio (CHAPRA, 1997), sendo o espaço vazio deixado suficiente.

4.2. Microcosmos experimento anaeróbio

Serão apresentados nesse trabalho resultados preliminares do experimento de biodegradação anaeróbia do etanol, que continua em execução. Esses experimentos foram realizados em microcosmos, sendo todos tratamentos em triplicata, e com repetições suficientes para 10 medidas, totalizando 120 microcosmos. Todo material utilizado no experimento foi previamente autoclavado 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Como o experimento aeróbio, o experimento anaeróbio foi montado dentro de uma capela desinfectada de fluxo laminar (figura 5). Como microcosmos, foram utilizados frascos de 12 mL, sendo todo volume ocupado. A concentração ideal mínima de nutriente foi obtida do modelo termodinâmico de McCarty (1969), apresentado no item 4.5. Foram feitos 4 tratamentos, sendo:

Tratamento 1 – 20 % da concentração ideal mínima de nutriente

- 1 mL do inóculo celular com microorganismos do solo de um aquífero não contaminado;
- 1 mL de etanol, obtendo a concentração inicial no microcosmo de 1000,00 mg/L;
- 2 mL da solução nutriente (modo de preparo: item 4.5.1);
- 8 mL de água deionizada autoclavada.

Tratamento 2 – 100 % da concentração ideal mínima de nutriente

- 1 mL do inóculo celular com microorganismos do solo de um aquífero não contaminado;
- 1 mL de etanol, obtendo a concentração inicial no microcosmo de 1000,00 mg/L;
- 10 mL da solução nutriente (modo de preparo: item 4.5.1).

Tratamento 3- Sem adição de nutriente

- 1 mL do inóculo celular com microorganismos do solo de um aquífero não contaminado;
- 1 mL de etanol, obtendo a concentração inicial no microcosmo de 1000,00 mg/L;
- 10 mL de água deionizada autoclavada.

Tratamento 4 – controle da atividade biológica

- 1 mL do inóculo celular com microorganismos do solo de um aquífero não contaminado;
- 1 mL de etanol, obtendo a concentração inicial no microcosmo de 1000,00 mg/L;
- 10 mL da solução nutriente (modo de preparo: item 4.5.1);
- 0,036g de azida (NaN_3) na concentração de 3g/L, para esterilizar o microcosmo.

Nesse experimento também foi utilizado o etanol da J. T. Baker (HPLC/UV). O procedimento para armazenagem dos microcosmos anaeróbios foi o mesmo procedimento realizado para os microcosmos aeróbios. Todos os frascos foram lacrados com septos de borracha 0,8 mm e 20 mm de diâmetro (Mod. HP), revestidos com teflon, e com lacres de alumínio (Mod. HP). Foram armazenados com ausência de luz em uma caixa de isopor, contendo um termômetro de bulbo de mercúrio para monitoramento da temperatura que se manteve-se em $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.3. Amostragem

A coleta foi realizada na Fazenda Experimental da Ressacada, localizada na parte sul da Ilha de Santa Catarina, região da Tapera, próxima ao Aeroporto Hercílio Luz, no município de Florianópolis pertencente à UFSC.

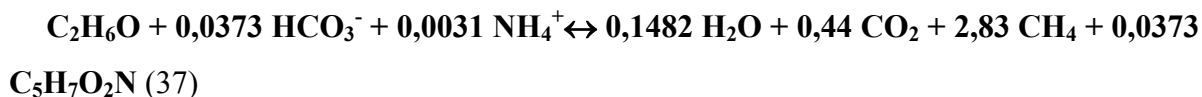
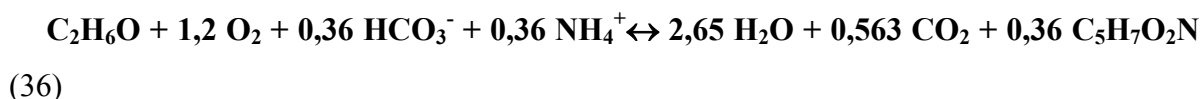
Todo material utilizado na coleta foi previamente desinfetado. Para atingir o nível do lençol freático (entre 0.5 e 1,5 m) utilizou-se uma escavadeira manual. O solo foi coletado neste nível com auxílio de uma espátula. Para sua preservação, os frascos com solo foram acondicionados em uma caixa de isopor até a chegada no laboratório.

4.4. Inóculo celular

O inóculo celular foi preparado adicionando-se 300 mL de água autoclavada em 300 g do solo coletado. Assim obteve-se uma solução com a concentração de $9,70 \times 10^7$ células/mL. Foi adicionado 1 mL deste inóculo no microcosmo. Desta forma obteve-se uma concentração de aproximadamente $8,08 \times 10^6$ células/mL no microcosmo. Estes números correspondem ao número total de células presentes no solo coletado, enumerados pelo método de contagem direta em microscópio de fluorescência. Não foram selecionadas espécies degradadoras de etanol. De acordo com WEBSTER (1985) uma população média de 10^6 a 10^7 de células/g de solo seco viabiliza a técnica de biorremediação.

4.5. Obtenção das Concentrações de Nutriente

Os nutrientes são essenciais para garantir as condições adequadas de crescimento dos microorganismos. Os nutrientes mais importantes para a biossíntese são o nitrogênio e o fósforo. Para estimar a relação entre carbono e nitrogênio, utilizou-se o modelo energético de cinética de crescimento bacteriano desenvolvido por McCARTY (1969). Este modelo é baseado na termodinâmica clássica, em que a energia livre liberada na reação é utilizada para estimar a produção de biomassa. Neste é possível obter a relação carbono-nitrogênio considerando o substrato e receptores de elétrons específicos (etanol e oxigênio para o processo aeróbio e etanol e CO_2 para o processo anaeróbio). Seguindo este modelo e utilizando como fonte nutritiva a amônia, foi obtida a seguinte reação para o processo aeróbio e para o anaeróbio (equação 36 e 37, respectivamente):



Desta reação foram obtidas as relação C:N, que foram utilizadas nos microcosmos. De acordo com Matthews (1994), a relação N:P é 10:1. A partir destas relações calculou-se a concentração de fósforo para ambos os experimentos. Assim, foi calculada a concentração ideal mínima necessária dos nutrientes nitrogênio e fósforo e 20% dessa concentração (a escolha de 20% da concentração ideal mínima de nutriente foi aleatória, almejando-se observar o comportamento de uma concentração mínima de nutriente menor que a necessária. Recomenda-se teste com outras concentrações).

4.5.1. Solução nutriente

A solução de nutrientes foi preparada modificada do meio Hutner's Mineral Salts Basal (MSB) (STANIER *et al.*, 1966).

O meio completo foi preparado por diluição de três soluções estoques: uma solução tampão (solução A), uma solução de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio (solução B) e uma fonte de minerais (solução C).

Solução A:

Experimento aeróbio: Foi dissolvido 0,2444 g K_2HPO_4 e 0,1566 g KH_2PO_4 em 1 L de água deionizada. Esta solução apresentou um pH de aproximadamente 7,2.

Experimento anaeróbio: Foi dissolvido 0,0183 g K_2HPO_4 e 0,0117 g KH_2PO_4 em 1 L de água deionizada. Esta solução apresentou um pH de aproximadamente 7,2.

Solução B:

Experimento aeróbio: Foi dissolvido 0,0679 g de $(NH_4)_2SO_4$ em 50mL de água deionizada.

Experimento anaeróbio: Foi dissolvido 0,005 g de $(NH_4)_2SO_4$ em 50mL de água deionizada.

Solução de ferro: Para o experimento aeróbio e para o anaeróbio foi dissolvido 0,25 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ em 50 mL de água deionizada. Adicionou-se algumas gotas de H_2SO_4 para retardar a precipitação.

Solução C: Foi dissolvido 14,45 g MgSO_4 ; 3,33 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,1421 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 99 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 50 mL da solução de ferro em água deionizada. Essa solução foi avolumada para 1 L.

Procedimento de preparo da Solução C:

1. Foi dissolvido o MgSO_4 , o CaCl_2 e o $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ junto com o FeSO_4 em 150 mL de água.
2. Avolumou-se a solução para 950 mL com água deionizada e o pH ajustado para 6,8 com NaOH 10N. Isto foi feito vagarosamente para o pH não exceder a 7,0 e resultar na formação de um precipitado.
3. Avolumou-se a solução para 1 L.

Para preparação do meio MSB propriamente dito, foram adicionados as seguintes soluções para 1 L:

1. Solução A \rightarrow 40mL
2. Solução B \rightarrow 20mL
3. Solução C \rightarrow 10 mL

Os sais utilizados no meio foram pesados em balança analítica (SHIMADZU, Mod Libror AEG-120g). Logo após o preparo o meio MSB foi esterelizado em autoclave a 120°C e 1 atm, por 20 minutos.

4.6. Procedimento analítico

A determinação das concentrações do etanol (em ambos experimentos) e do metano (experimento anaeróbio) nos microcosmos foi realizada através de cromatografia gasosa, seguindo as normas 8015^M da Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA) As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (CG) Mod. Hewlett Packard modelo 5890 – série II, equipado com detector por ionização de chama (FID), coluna capilar de sílica fundida: HP 1 (metil siloxano) n° 19095Z-123 (HP, USA) com 0,53mm de diâmetro interno, com 30m de comprimento e espessura do filme de 2,65 μm , amostrador automático Headspace Auto sampler (HS) Mod. Hewlett Packard 7694, nas condições descritas no Apêndice I. O gás de arraste empregado foi o nitrogênio, com velocidade de 2,0mL/min em todas as análises. As análises foram realizadas diariamente no experimento aeróbio e mensalmente para o experimento

anaeróbio. Através de seringas esterilizadas “gas-tight” (Mod. Hamilton, Reno, Nev.) foram retiradas alíquotas de 10 mL, sendo que todos os tratamentos foram analisados em triplicata e os frascos foram descartados após análise. A integração das áreas dos picos foi realizada utilizando-se o programa ChemStation versão Rev A.05.01 273 – HP 90-97. Um cromatograma típico de uma amostra analisada pode ser visto no apêndice II e o Apêndice III sumariza as condições de trabalho utilizadas no HS e no CG.

A precisão dos dados obtidos no CG foi testada de acordo com a percentagem de recuperação do “fortificado” (SPIKE), segundo normas descritas pela EPA/8015^A (Tabela 1). Fortificado é o nome dado à solução através da qual se verifica a exatidão (resultado obtido próximo ao esperado) e a precisão do equipamento. A percentagem de recuperação foi determinada pela seguinte equação:

$$ps = 100x \frac{A}{T}, \quad (38)$$

onde A é a concentração obtida na análise, e T é a concentração esperada. O limite de qualidade total, ou a percentagem da exatidão da análise após a medida das amostras (p), foi determinado usando-se a média da porcentagem de recuperação das amostras (média de $ps=p$) e o seu desvio padrão (Sp), através das seguintes equações:

$$p - 2Sp \quad e \quad p + 2Sp. \quad (39)$$

Tabela 1: Porcentagem de recuperação do “fortificado” obtido para análises do etanol em CG HP5890.

COMPOSTOS	Porcentagem de recuperação em (%)				Limite de detecção(%)
Etanol	116,06	96,81	108,5	106,04	91-123
Metano	96,05	83,25	91,32	98,33	79-106

Juntamente com cada medida foi analisado um frasco contendo uma concentração conhecida. A partir da diferença entre a concentração conhecida calculada e o resultado desta obtido pelo cromatograma, fez-se a correção de todos os dados de concentração do etanol.

4.7. Contagem celular

Para a contagem das bactérias aeróbias e anaeróbias, o número de bactérias/mL e biomassa foram determinados com base na microscopia direta de fluorescência (KING & PARKER, 1988; SIERACKI *et al.*, 1985; HOBIE *et al.*, 1977) . Segundo vários autores, os microorganismos podem ser contados utilizando-se microscopia direta e suas biomassas estimadas por fatores de conversões.

Para a determinação deste valor foram coletados, dentro da câmara de fluxo laminar esterelizada, 10 µL de cada amostra em micropipeta e espalhados sobre uma lâmina de vidro para microscopia. As amostras foram fixadas com calor e coradas com alaranjado de acrinidina em concentração de 0,01% por 2 minutos, e então lavadas com água. As mesmas foram revestidas com papel absorvente para proteção à luz e conservadas em geladeira para posterior contagem.

A contagem dos corpos celulares foi feita em 7 campos de visão por lâmina observados em microscópio trinocular (Mod. OLYMPUS - BX40), em aumento de 1000x em óleo de imersão e sob fluorescência (lâmpada de halogênio Mod. Phillips 7724; 100 WHAL).

A área do campo visual, obtida através de medição com lâmina micrométrica (Olympus – 0,02 mm), foi de aproximadamente $4,25 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$. O número aproximado de células por mL da amostra foi determinado através da fórmula:

Número de Células/ mL = média do número de células por campo x área total x 1 mL/área do campo visual ($4,25 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$) x volume colocado na lâmina (0,01mL).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Introdução

Os efeitos dos nutrientes na cinética de biodegradação aeróbia do etanol foram determinados através de experimentos em microcosmos. Os dados obtidos no experimento de biodegradação aeróbia do etanol, assim como os dados da concentração celular, estão apresentados no Apêndice IV. No apêndice V estão apresentados os dados iniciais obtidos no experimento de biodegradação anaeróbia do etanol. Para facilitar a leitura das figuras apresentadas na discussão, os desvios padrão não foram apresentados nestas, e sim em tabelas, nos Apêndices IV e V, assim como as médias obtidas.

Vale lembrar que esta dissertação de mestrado é parte de um estudo multidisciplinar, sobre a cinética de degradação do etanol em condições aeróbicas e anaeróbicas em condições limitantes de nitrogênio e fósforo, envolvendo dois trabalhos de conclusão de curso, um na Engenharia Sanitária e Ambiental e outro na Biologia. O trabalho de degradação anaeróbia do etanol em condições limitantes de nitrogênio e fósforo prevê continuidade e aqui serão apenas mencionadas algumas comparações iniciais com o experimento aeróbio.

5.2. Biodegradação do etanol

5.2.1. Biodegradação aeróbia do etanol

5.2.1.1. Determinação dos parâmetros biocinéticos de biodegradação aeróbia do etanol

A determinação da cinética microbiana foi obtida empiricamente por conservação de massa para a biomassa e para o substrato, com base na equação de Monod (SIMKINS & ALEXANDER, 1984; KLECKA & MAIER, 1985; CORSEUIL, 1994; CORSEUIL & WEBER, 1994).

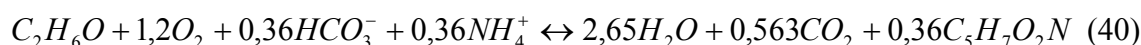
Cálculo da biomassa inicial (X_0)

A concentração da biomassa em mg foi convertida do número de células considerando-se uma célula microbiana com um peso seco de 2×10^{-10} mg (McCARTY).

Assim, a concentração celular inicial X_0 (células/ml) foi convertida em biomassa através de regra de três simples fornecendo os valores em mg/L.

Cálculo do coeficiente de produção celular (Y)

Através do modelo de McCarty (1969) pode-se obter a equação abaixo, que possibilitou o cálculo do Y.



Massa molecular do etanol (C_2H_6O): 46000mg/mol

Massa molecular das células microbianas ($C_5H_7O_2N$): 113000mg/mol

Fazendo a relação entre as células e o substrato a partir desta estequiometria obtém-se o valor do coeficiente de produção celular:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol } C_2H_6O : 0,36 \text{ mol } C_5H_7O_2N \\ 46000 : 113000 \cdot 0,36 \end{array}$$

$$Y = \frac{40680}{46000} = 0,88 \frac{mg_{células}}{mg_{substrato}}$$

Obtenção do μ_{\max} e K_s

Para encontrar os valores de μ_{\max} e K_s utilizou-se a equação 20 (revisão bibliográfica, item 3.10.), os dados de entrada ds/dt admitidos como variável dependente e S como variável independente.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-\mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} [X_0 + Y(S_0 + S)]}{Y}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-\mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} [X_0 + 0,88(S_0 + S)]}{0,88}$$

Substituindo os valores de entrada X_0 , S_0 para cada experimento e colocando esta equação no programa STATISTICA através da regressão não-linear obteve-se os seguintes valores para μ_{\max} e K_s .

Tabela 2: Obtenção de μ_{\max} e K_s para os três tratamentos

	Y (mg célula/ mg substrato)	X_0 (mg/L)	S_0 (mg/L)	μ_{\max} (d ⁻¹)	K_s (mg/L)	R	Variância (%)
Sem nutriente	0,88	2,60	112,32	0,197	121,10	0,92	84,76
20% de nutriente	0,88	2,49	112,32	2,50	192,99	0,54	29,08
100% de nutriente	0,88	3,61	112,32	1,30	21,22	0,88	76,90

5.2.1.2. Influência do nutriente nos parâmetros biocinéticos

Através das figuras 6, 9, 11, 13 e 15 são observados os resultados da degradação do etanol e da biomassa nos 3 tratamentos, bem como do tratamento controle. Quanto aos coeficientes de máxima produção celular Y (tabela 2), determinados neste trabalho, foram obtidos 0,88 mg célula/mg substrato. Esse valor foi obtido estequiometricamente, como apresentado acima, onde é relacionada a energia livre de reação destes compostos com a produção celular máxima. Corseuil (1994) e Corseuil & Weber (1994) determinaram valores de Y, segundo modelos termodinâmicos de McCarty (1975) de degradação dos compostos tolueno, benzeno e xileno, utilizando também como base, cálculos estequiométricos. Os valores encontrados por estes autores foram de 0,65, 0,66 e 0,67 mg (células) mg(substrato)⁻¹ para benzeno, tolueno e xileno, respectivamente. Esse maior valor de Y para o etanol provavelmente está relacionado ao etanol ser um composto energeticamente mais favorável a degradação, gerando maior número de células por concentração de substrato.

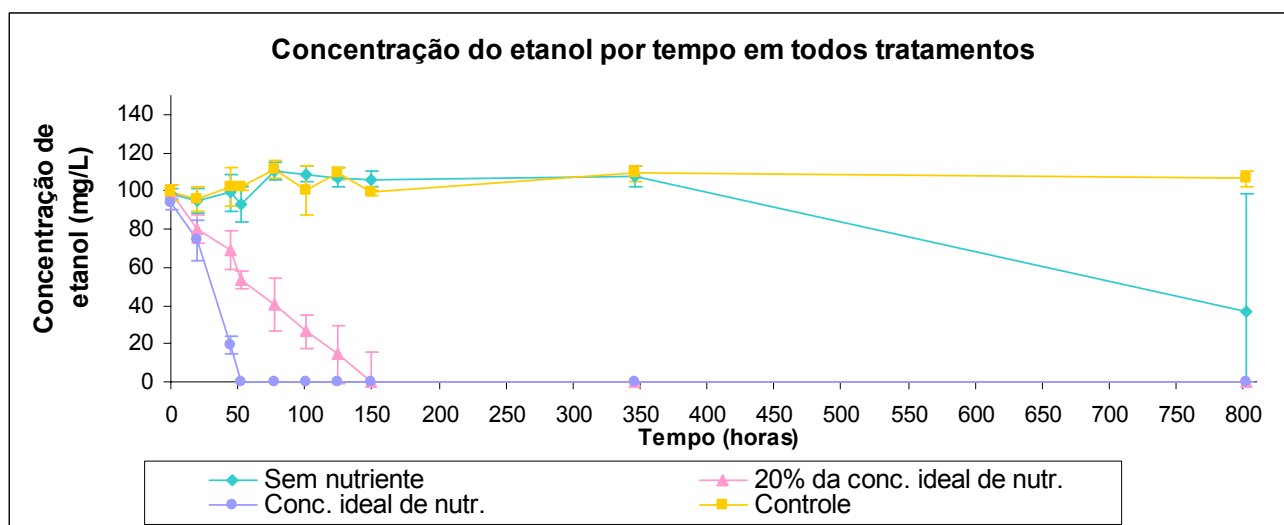


Figura 6 – Concentração do etanol por tempo em todos os tratamento (as barras referem-se ao desvio padrão)

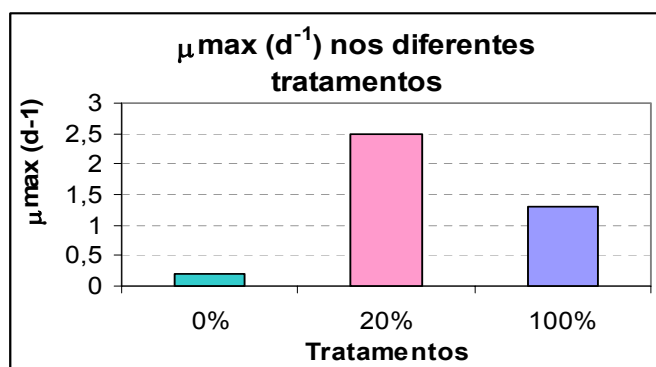


Figura 7 – $\mu_{\text{máx}}$ em todos os tratamento

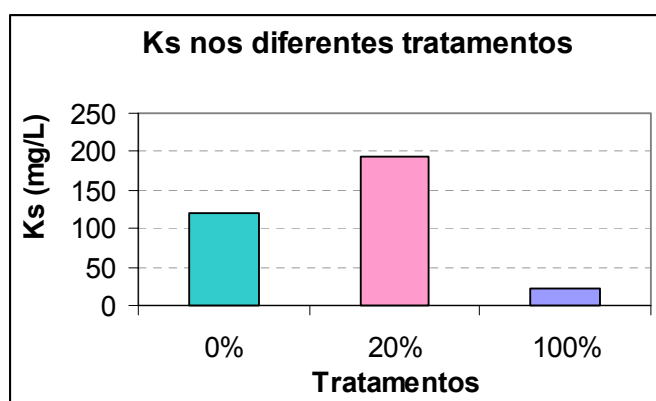


Figura 8 – Ks em todos os tratamento

A degradação do etanol no tratamento com concentração ideal de nutrientes foi muito mais rápida que a dos demais tratamentos (figura 6 e 9). Neste, todo etanol adicionado foi eliminado em 53 horas, quando o tratamento com adição de 20% de solução nutriente ainda apresentava 53,31 mg/L de etanol (figura 6 e 11) e, o sem adição de nutrientes, 92,81 mg/L (figura 6 e 13). As taxas de utilização máxima do substrato $\mu_{\text{máx}}$, para o tratamento com a concentração ideal de nutrientes foi de $1,30 \text{ d}^{-1}$ (Tabela 2 e figura 7). O coeficiente de meia-velocidade K_s obtido para este tratamento foi de 21,22 mg/L (Tabela 2 e figura 8). Os valores obtidos da taxa específica de crescimento máxima (tabela 2, figura 7 e figura 8) são maiores ($1,2 \text{ d}^{-1}$) do que para culturas metanogênicas acetoclásticas puras, *Methanosarcina barkeri* $\mu_{\text{máx}}=0,696 \text{ d}^{-1}$ e *Methanosarcina mazei* $\mu_{\text{máx}}=0,912 \text{ d}^{-1}$, usualmente encontradas em sistemas de tratamento anaeróbios de efluentes (YANG *et al.*, 1987). Esse maior valor de $\mu_{\text{máx}}$ é coerente, já que sabe-se que o processo anaeróbico é mais lento. A constante de meia-saturação tem valor menor (190 mg/L) dos citados para estas duas culturas, $K_s=1000 \text{ mg/L}$ e $K_s=1750 \text{ mg/L}$, respectivamente. Como K_s é um parâmetro que dá uma indicação da afinidade dos microorganismos pelo substrato, esse valor menor indica maior afinidade dos microorganismos pelo substrato etanol do que em sistemas anaeróbios de efluentes, que contém substratos mais complexos e menos energeticamente favoráveis a degradação. Para decomposição aeróbica do substrato o valor de K_s geralmente é menor que 20 mg/L (McCARTY, 1972). No entanto, em nenhum tratamento K_s foi menor que 20 mg/L, podendo estar relacionado a afinidade e concentração das bactérias contidas no inóculo.

Nas figuras 10, 12 e 14 foram feitos gráficos da concentração do substrato por velocidade específica de crescimento bacteriano num dado instante para todos os tratamentos. Em todos os tratamentos a velocidade específica de crescimento bacteriano diminuiu com a diminuição da concentração do substrato, sendo a maior velocidade específica, em menor concentração do substrato, maior para o tratamento com concentração ideal de nutriente.

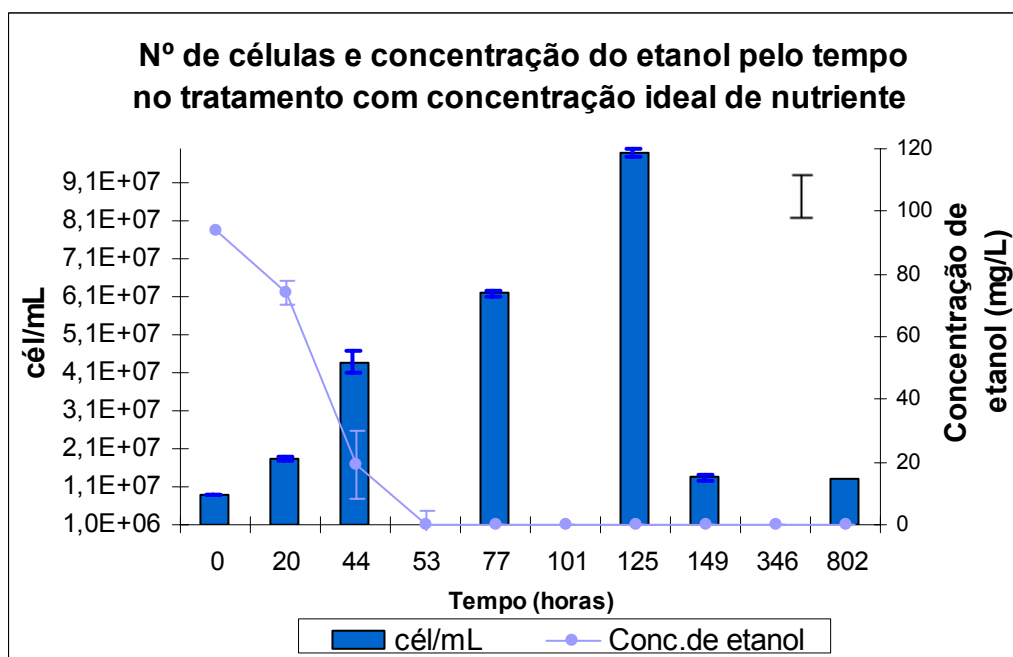


Figura 9 – Nº de células/mL e concentração do etanol por tempo no tratamento com concentração ideal de nutriente (A barra ao canto significa diferença mínima significativa entre as medidas-fig. 9, 11, 13 e 15 e a barra nos pontos e nas colunas referem-se ao desvio padrão). obs: O eixo da variável “tempo” não se encontra em escala.

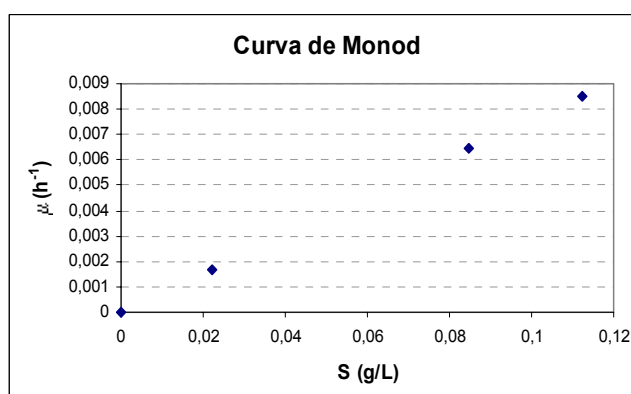


Figura 10 – Concentração do substrato por velocidade específica de crescimento bacteriano num dado instante para a concentração ideal de nutrientes

A concentração de 0 mg/L de etanol, foi atingida em 149 horas (pouco mais que 6 dias) no tratamento com 20% do ideal da concentração de nutrientes (figura 12 e 14). De acordo com esses dados, é importante ressaltar que a adição de nutrientes, mesmo que em condições abaixo do ideal mostrou o aumento da eficiência do processo de biodegradação. A taxa de utilização máxima do substrato $\mu_{\text{máx}}$, para o tratamento com a concentração ideal de nutrientes foi de 2,50 d⁻¹ (Tabela 2 e figura 7). O coeficiente de meia-velocidade K_s obtido para este tratamento foi de

192,99 mg/L (Tabela 2 e figura 8). Salienta-se que o R desse tratamento (tabela 2) foi insatisfatório estatisticamente, não se adequando ao modelo, assim interferindo nos valores de K_s e $\mu_{\text{máx}}$. Além disso, a biomassa do tratamento com a concentração ideal de nutriente e do tratamento sem nutriente podem ter sido subestimadas em relação ao do tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente, ou ainda, a biomassa deste tratamento foi superestimada.

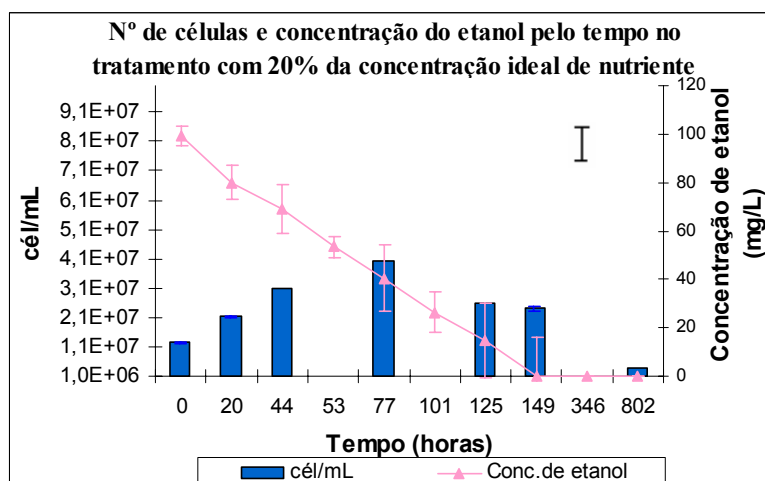


Figura 11 – Nº de células/mL e concentração do etanol por tempo no tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente (A barra ao canto significa diferença mínima significativa entre as medidas-fig. 9, 11, 13 e 15 e a barra nos pontos e nas colunas referem-se ao desvio padrão). obs: O eixo da variável “tempo” não se encontra em escala.

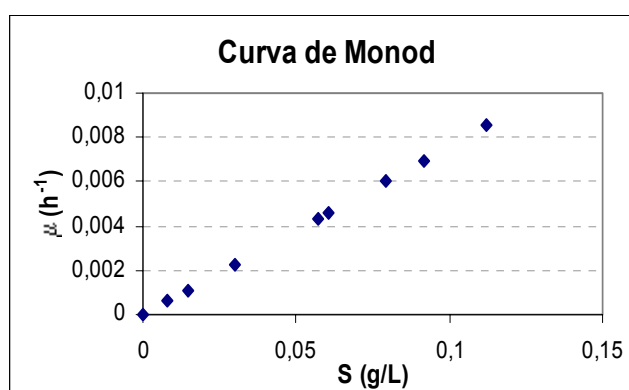


Figura 12 – Concentração do substrato por velocidade específica de crescimento bacteriano num dado instante para 20% da concentração ideal de nutriente

Já no tratamento sem a adição de nutrientes a degradação do etanol apresentou-se, comparativamente aos demais tratamentos, mais lenta. Em 802 horas (mais de 33 dias) (figura 6 e 15) a média dos três microcosmos foi de 36,70 mg/L, sendo que um dos microcosmos da

triplicada apresentou 0 mg/L de etanol. A taxa de utilização máxima do substrato $\mu_{\text{máx}}$, para o tratamento sem adição de nutrientes foi de $0,197 \text{ d}^{-1}$ (Tabela 2 e figura 7), a menor taxa como era esperado, evidenciando a influência do nutriente nos parâmetros biocinéticos. O coeficiente de meia-velocidade K_s obtido para este tratamento foi de $121,10 \text{ mg/L}$ (Tabela 2 e figura 8).

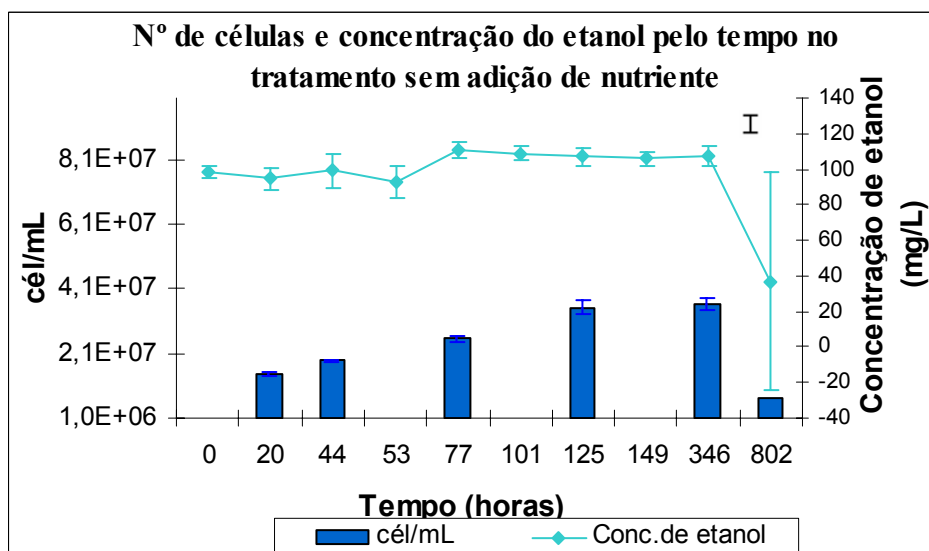


Figura 13 – Nº de células/mL e concentração do etanol por tempo no tratamento sem adição de nutriente (A barra ao canto significa diferença mínima significativa entre as medidas-fig. 9, 11, 13 e 15 e a barra nos e nas colunas referem-se ao desvio padrão). obs: O eixo da variável “tempo” não se encontra em escala.

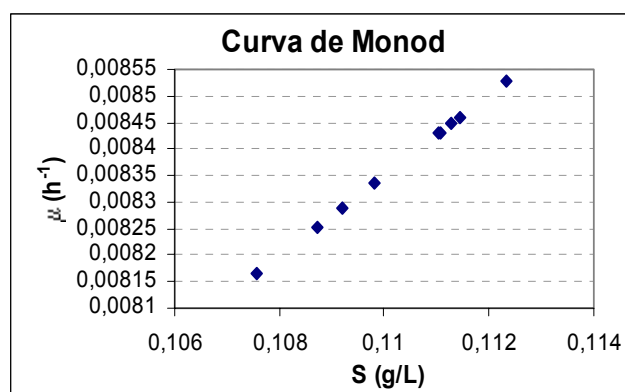


Figura 14 – Concentração do substrato por velocidade específica de crescimento bacteriano num dado sem adição de nutriente

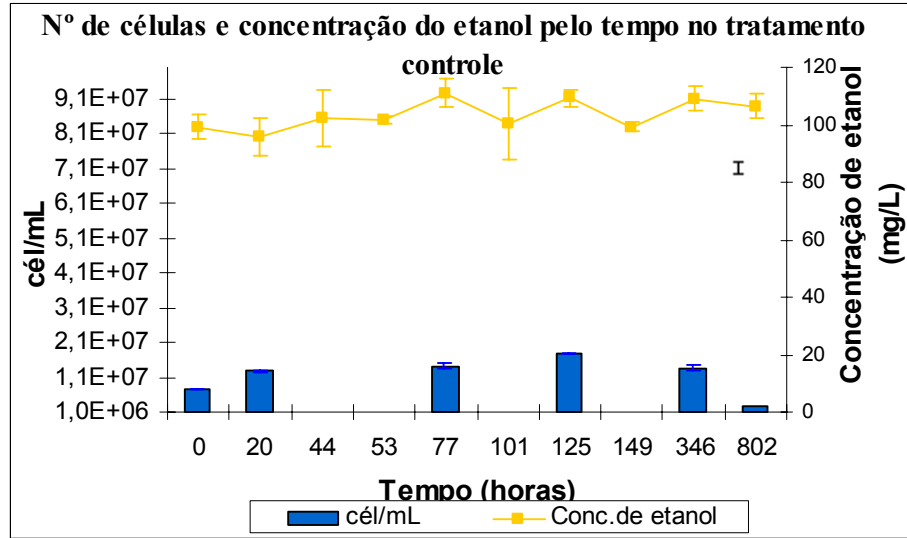


Figura 15 – Nº de células/mL e concentração do etanol por tempo no tratamento sem adição de nutriente (A barra ao canto significa diferença mínima significativa entre as medidas-fig. 9, 11, 13 e 15 e a barra nos pontos e nas colunas referem-se ao desvio padrão) obs: O eixo da variável “tempo” não se encontra em escala.

O valor de $\mu_{\text{máx}}$ obtido para o tratamento com a concentração ideal mínima de nutriente do etanol foi superior em cerca de 84,85% em relação ao tratamento sem adição de nutriente. O valor de K_s para o tratamento com a concentração ideal mínima de nutriente etanol diminuiu em 82,48% em relação ao tratamento sem adição de nutriente.

5.2.1.3. Curvas obtidas no experimento e a comparação com o modelo testado

Nos gráficos de substrato foram plotados duas curvas, uma com os dados experimentais e a outra com dados simulados através do modelo:

$$C_1 \ln \left(\frac{Y(S_0 - S) + X_0}{X_0} \right) - C_2 \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = \mu_{\text{máx}} t \quad (21)$$

Onde:

$$C_1 = \frac{K_s Y + Y S_0 + X_0}{Y S_0 + X_0};$$

$$C_2 = \frac{Y K_s}{Y S_0 + X_0}$$

Nos gráficos de biomassa também foram plotados duas curvas, de dados experimentais e de dados simulados, a partir da equação 29 (revisão bibliográfica, item 3.10.):

$$X = X_0 e^{\left(\mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}\right)t} \quad (29)$$

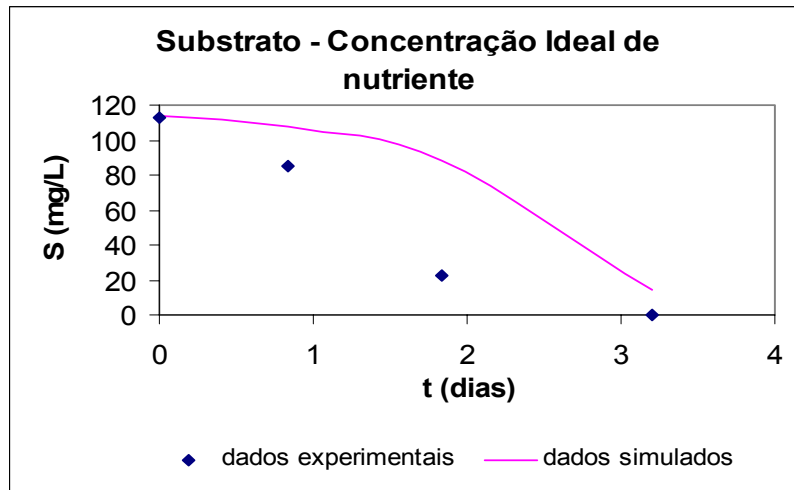


Figura 16 – Dados simulados e experimentais do substrato para o tratamento com a concentração ideal de nutriente

Em relação a figura 16, nota-se que a curva de simulação não está bem ajustada aos dados experimentais, isso pode estar relacionado a uma estimativa inicial de microorganismos (X_0) subestimada. Nota-se que a degradação do substrato foi mais rápida para os dados experimentais, evidenciando a influência do nutriente. Sendo que esse foi o tratamento que menos se adequou ao modelo o que pôde estar relacionado com não ter sido detectado exatamente o final da degradação do etanol.

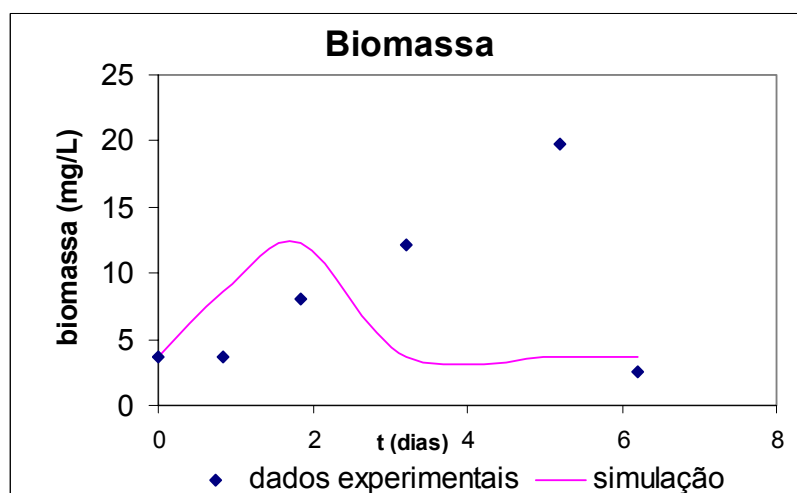


Figura 17 – Dados simulados e experimentais da biomassa para o tratamento com com a concentração ideal de nutriente

Quanto a biomassa (figura 17), teve uma aparente fase lag nos dados experimentais e no terceiro dia, onde todo etanol havia sido degradado, os dados da biomassa experimentais continuaram em crescimento, o que pode estar relacionado a degradação de subprodutos do etanol, como acetato. O modelo porém (equação 29) não leva em conta a presença de outros substratos.

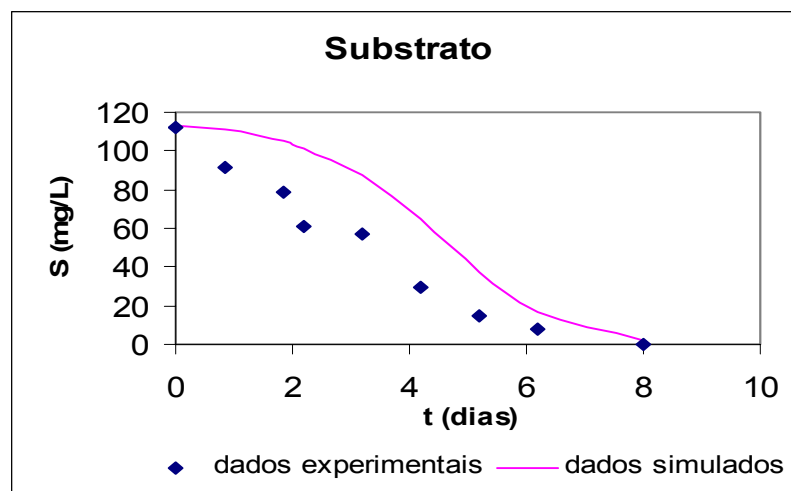


Figura 18 – Dados simulados e experimentais do substrato para o tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente

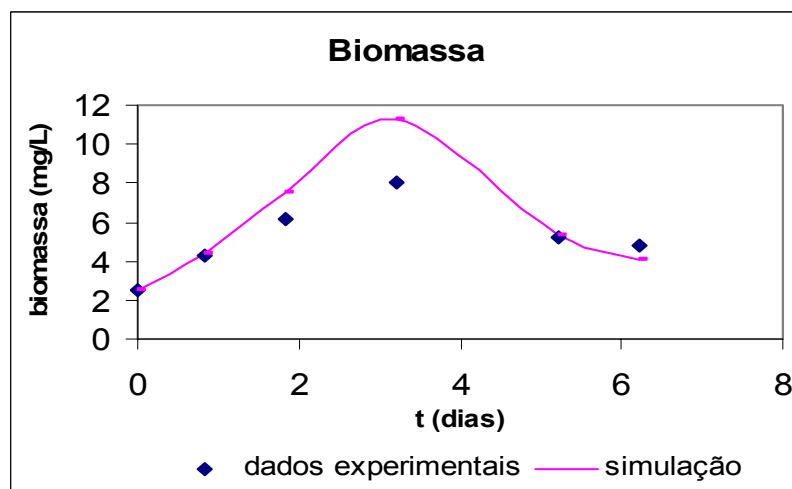


Figura19 – Dados simulados e experimentais da biomassa para o tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente

Observando-se a figura 18, relativa ao tratamento com 20% da concentração ideal de nutrientes, vê-se que o modelo ajustou-se melhor.

Quanto a biomassa (figura 19), os dados experimentais ficaram bem ajustados a curva de dados simulados, com exceção dos dados referentes a 4 dias depois do início do experimento. O modelo pode ter se adequado melhor a esse tratamento pela menor disponibilidade de nutriente, não ocorrendo um aumento tão acentuado da biomassa como no tratamento com a concentração ideal de nutriente. Esses dados experimentais deslocados da curva de dados simulados podem estar relacionados com a disponibilidade do nutriente, que fez que houvesse um decréscimo da biomassa mais lentamente nos dados experimentais do que nos dados simulados.

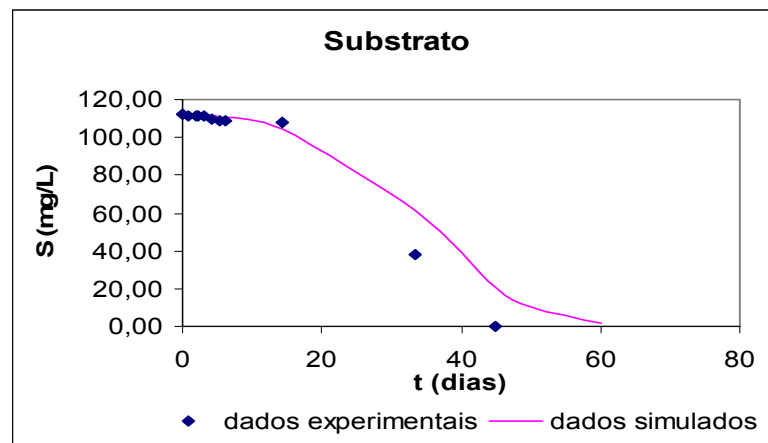


Figura 20 – Dados simulados e experimentais do substrato para o tratamento sem nutriente

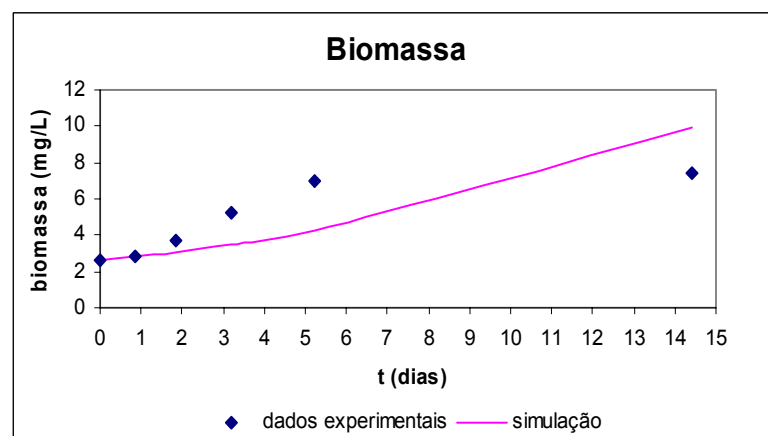


Figura 21 – Dados simulados e experimentais da biomassa para o tratamento sem nutriente

A simulação dos dados de substrato sem adição de nutriente (figura 20) apresentou-se bem ajustada ao dados experimentais, sendo que após 30 horas o dado experimental decaiu mais rapidamente a concentração do etanol. Quanto a biomassa (figura 21), houve um aumento nos dados experimentais mais do que nos dados simulados, com exceção do último ponto. Esse fato pode estar relacionado a degradação de outros substratos, já que foi utilizado como inóculo solo com diferentes fontes nutritivas e substratos. No último ponto (14 horas após o início do experimento), a biomassa mostrou-se menor para os dados experimentais, o que pode estar relacionado com a deficiência do nutriente, que pode ter sido praticamente todo consumido anteriormente e a biomassa já se encontrava em declínio.

5.2.1.4. Análise do crescimento bacteriano em função das diferentes disponibilidades de nutrientes

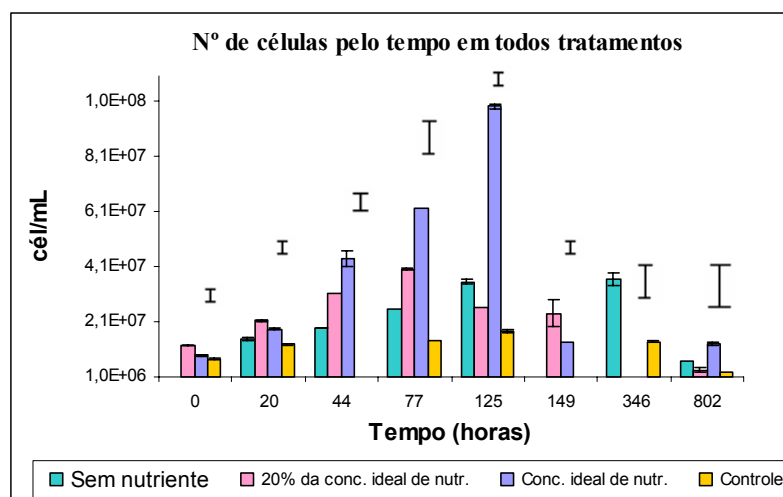


Figura 22 – Número de células por tempo em todos tratamentos (A barra acima de cada tempo significa diferença mínima significativa entre os tratamentos e a barra sobre as colunas referem-se ao desvio padrão) obs: O eixo da variável “tempo” não se encontra em escala.

O número de células bacterianas foi quantificado através de microscopia direta de fluorescência em todos os tratamentos. As figuras 9,11,13 apresentam a degradação de etanol em cada tratamento, relacionada com o respectivo número de células. O tratamento controle (Figura 15) evidencia a relação entre atividade microbiológica e degradação do etanol no microcosmo. Neste, os microorganismos foram inativados por azida sódica. O número de células quantificado

trata-se de uma dificuldade do método utilizado, que cora também microorganismos inativos. Já variações na concentração do etanol são explicadas pela imprecisão do cromatógrafo, que foi compensado por análises simultâneas as análises de concentrações conhecidas de etanol.

O tratamento com a concentração ideal de nutriente, como esperado (Figura 9 e 22), foi o que degradou mais rapidamente todo o etanol (53 horas) e foi o tratamento que atingiu maiores valores celulares ($9,9 \times 10^7$ cél/mL), mostrando a influência do nutriente. Esse número de células corresponde a 72 horas após o término do etanol. Este comportamento foi percebido também em experimento com *Pseudomonas putida* (Silva, 1998). Os resultados obtidos durante a fase de crescimento celular, demonstraram que mesmo após a completa degradação do etanol, as células bacterianas, mantiveram o crescimento. A presença de outros compostos intermediários ou subprodutos formados pela metabolização do substrato suportam a idéia de que subprodutos serviram de substrato para manutenção do crescimento celular acarretando esse crescimento.

No tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente (figura 11 e 22), o ápice do número de células foi em 77 horas (figura 22). A degradação total do etanol foi 149 horas (figura 11), quando a população microbiana já apresentava queda.

Quando baixas concentrações de químicos são introduzidos no ambiente, a degradação detectável dos compostos é freqüentemente precedida de uma fase de aclimação (LARSON, 1980; LARSON *et al.*, 1981 & SUBBA-RAO *et al.*, 1982, CORSEUIL & WEBER 1994). O tratamento sem adição de nutrientes apresentou um grande período onde não foi quantificada degradação do etanol. Houve um pequeno aumento do número de células e lenta degradação do etanol, atingindo quase 0 somente em 804 horas (figura 13). A fase lag de degradação é influenciada por vários processos, como transferência de massa, co-metabolismo e adaptação enzimática ou para mutações genéticas e tolerância ao tóxico (WIGGINS *et al.*, 1987; NYHOLM & MADSEN, 1995).

Outro fator relacionado ao retardo inicial da degradação do etanol, no tratamento sem adição de nutriente, pode ser a presença de outro substrato nos microcosmos, já que o inóculo adicionado foi proveniente de diluições de solo, assim sendo adicionada uma quantidade de matéria orgânica. Esta matéria orgânica adicionada pode ter servido como substrato preferencial, assim retardando o início da degradação do etanol. Nos tratamentos com concentração ideal de nutriente e com 20% desta, essa estabilidade inicial pode não ter sido observada por ter sido mais rápida e assim não ter sido caracterizada na metodologia do trabalho utilizada.

Além desses fatores, salienta-se que o fator mais importante é a necessidade das populações bacterianas atingirem concentração suficiente para degradação do composto ser detectada. Em águas subterrâneas, as populações de microorganismos podem estar em baixa concentração resultando em períodos de estagnação, antes que a degradação do contaminante possa ser percebida, mesmo em situações favoráveis de nutrientes e oxigênio. Este se deve ao tempo necessário para alcançar uma biomassa crítica. Apesar da quantidade de microorganismos inoculada inicialmente ($8,08 \times 10^6$ células/mL) já permitir uma biodegradação perceptível (WEBSTER, 1985), este número refere-se à comunidade total de microorganismo e pode incluir espécies sem a capacidade de degradar etanol. Assim, o número de microorganismos capazes de degradar o etanol pode ter sido inferior ao mínimo necessário. Assim que foi atingida a concentração crítica da população degradadora de etanol, foi iniciado sua degradação. Salienta-se que coincide a diminuição da concentração de etanol com um decréscimo do número de células bacteriana.

Em experimento feito também em microcosmos com excesso de nutrientes, 300 mg/L de etanol foram totalmente degradados por uma cultura pura de *Pseudomonas putida*, com concentração inicial de $3,05 \times 10^3$ células/mL, em 44 horas. (SILVA, 1998). A cultura mista utilizada neste experimento apresentou performance inferior, demorando mais tempo para degradar uma quantidade inferior de etanol (53 horas, com o número de células inicial de $8,08 \times 10^6$ células/mL). O crescimento bacteriano também foi inferior. Este resultado já era esperado por ser *Pseudomonas putida* uma espécie de conhecida eficiência na degradação de contaminantes orgânicos, enquanto no inóculo utilizado neste trabalho não houve seleção de microorganismos, além da concentração de nutriente utilizada ter sido inferior.

5.2.2. Biodegradação anaeróbia do etanol

5.2.2.1 Comparação do experimento aeróbio com o experimento anaeróbio

Pelo fato de ser liberada mais energia através das reações aeróbias que através das reações anaeróbias, os microorganismos aeróbios se reproduzem mais rapidamente e a estabilização aeróbia da matéria orgânica se processa a taxas mais rápidas que a anaeróbia. Isso foi claramente observado entre os experimentos onde observou-se a que a degradação aeróbia do etanol em todos os tratamentos foi muito mais rápida que ao dos tratamentos do experimento anaeróbio. No experimento aeróbio (concentração inicial de 112,32mg/L) todo o etanol

adicionado foi degradado em 53 horas no tratamento com a concentração ideal de nutriente. No tratamento com adição de 20% de solução nutriente, só depois de 149 horas todo etanol foi degradado e, no tratamento sem adição de nutrientes, em 802 horas (aproximadamente 33 dias) apresentava 38,24 mg/L. Já no experimento anaeróbio (figura 23) (concentração inicial de 1000,00mg/L) todos tratamentos não apresentaram concentração menor que 975,56mg/L no período de 33 dias. Em 84 dias após o início do experimento anaeróbio o tratamento com a concentração ideal de nutriente apresentou 861,77 mg/L de etanol, o tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente apresentou 954,28 mg/L e no tratamento sem adição de nutriente apresentou toda concentração do etanol adicionado. Os dados brutos relativos ao experimento aeróbio e aneróbio estão no apêndice IV e V.

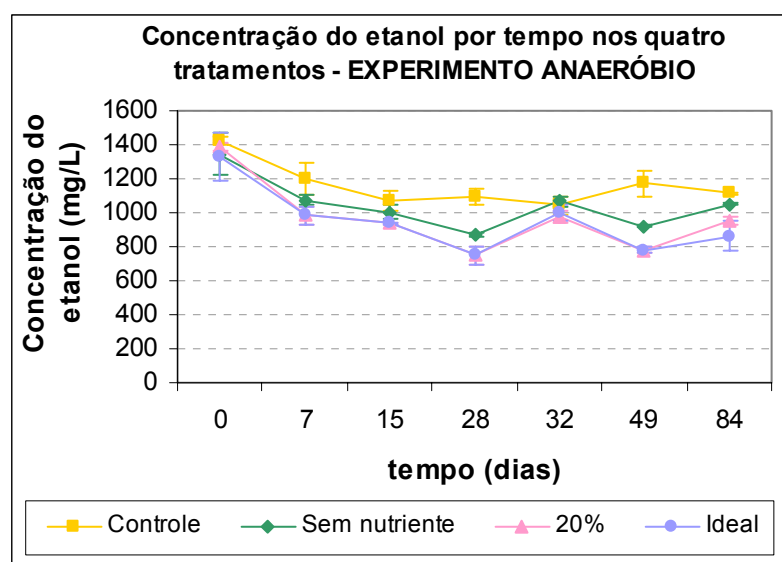


Figura 23 – Concentração do etanol por tempo nos quatro tratamentos – EXPERIMENTO ANAERÓBIO

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

6.1. Conclusões

O presente estudo avaliou os efeitos dos nutrientes nitrogênio e fósforo no comportamento cinético de biodegradação aeróbica do etanol, bem como no crescimento bacteriano. Assim, as principais conclusões obtidas neste trabalho foram:

As taxas aeróbicas de utilização máxima de substrato ($\mu_{\text{máx}}$) para os diferentes tratamentos foram: $1,30\text{d}^{-1}$ para o tratamento com concentração ideal mínima de nutrientes, $2,50\text{d}^{-1}$ para o tratamento com 20% da concentração ideal mínima de nutriente e $0,197^{-1}$ para o tratamento sem adição de nutriente, evidenciando a influência do nutriente nos parâmetros biocinéticos. Em termos percentuais, $\mu_{\text{máx}}$ foi 85% maior para o tratamento com concentração ideal de nutriente em relação ao tratamento sem adição de nutriente.

Os valores aeróbicos do coeficiente de meia-velocidade (Ks) obtidos para a degradação de etanol foram de 21,22 mg/L para o tratamento com concentração ideal mínima de nutrientes, 192,99 mg/L para o tratamento com 20% da concentração ideal mínima de nutriente e 121,10mg/L para o tratamento sem adição de nutriente. Como Ks é um parâmetros que dá uma indicação da afinidade dos microorganismos pelo substrato, esses valores indicam a afinidade dos microorganismos pelo substrato etanol. O valor de Ks para o tratamento com concentração ideal de nutriente é muito menor (82%) do que no tratamento sem adição de nutriente, o que demonstra como a presença do nutriente é significativa para biodegradação do etanol.

O tratamento com a concentração ideal de nutriente, como esperado, foi o que degradou mais rapidamente a concentração total de etanol (53 horas) e foi o tratamento que atingiu maiores valores de biomassa ($9,9 \times 10^7$ cél/mL). Essa biomassa corresponde a 72 horas após o término do etanol.

Na presença de concentração ideal de nutrientes, a concentração total de etanol foi degradada em 53 horas. Na presença de 20% da concentração ideal, todo etanol foi degradado em 149 horas. Já na ausência de nutrientes, o etanol não foi completamente degradado em 802

horas. Nesse tratamento foi detectado um grande período onde não foi quantificada degradação do etanol, o que demonstra que o lento crescimento dos microorganismos influenciou diretamente na velocidade de degradação do etanol. É importante ressaltar que adição de nutrientes, mesmo que em condições abaixo do ideal mostrou o aumento da velocidade de biodegradação.

As maiores concentrações celulares foram de $9,89 \times 10^7$ células/mL (em 125 horas); 4×10^7 células/mL (em 77 horas); $3,63 \times 10^7$ células/mL (em 346 horas), nos tratamentos com concentração ideal de nutriente, 20% deste, e sem adição de nutrientes, respectivamente.

A degradação aeróbia do etanol em todos os tratamentos foi muito mais rápida que ao dos tratamentos do experimento anaeróbio. Da concentração inicial de 1000,00mg/L em todos tratamentos nenhum apresentou concentração menor que 975,56mg/L no período de 33 dias. Após 84 dias do início do experimento anaeróbio o tratamento com a concentração ideal de nutriente apresentou 861,77 mg/L de etanol, o tratamento com 20% da concentração ideal de nutriente apresentou 954,28 mg/L e no tratamento sem adição de nutriente apresentou toda concentração do etanol adicionado.

Como conclusão geral, tem-se que em casos de derramamentos de gasolina com etanol, a adição de nutrientes irá acelerar a degradação deste, o que evitará que o etanol interfira na degradação dos contaminantes aromáticos mais tóxicos (BTEX). A presença do etanol nos derramamentos de gasolina exaure as concentrações de oxigênio e de receptores de elétrons necessários para a degradação destes compostos tóxicos BTEX. O etanol é preferencialmente biodegradado, por ser energeticamente favorável, sendo que os compostos BTEX só serão degradados após o término deste. Desta forma, a presença de etanol no aquífero por longos períodos de tempo fará com que as plumas dos compostos tóxicos (BTEX), se desloquem e atinjam pontos mais afastados da fonte onde ocorreu o derramamento, podendo atingir aquíferos que são utilizados como fontes de abastecimento de água para consumo humano. Ressalta-se que em derramamentos sem a presença de etanol não é necessário a adição de nutrientes, uma vez que a massa de substrato presente no aquífero é baixa, devido a pequena solubilidade dos compostos BTEX. Desta forma, conclui-se que em derramamentos de gasolina com etanol, em

caso da necessidade de medidas de biorremediação ativa, a adição de nutrientes poderá evitar o efeito negativo da interferência do etanol na degradação dos compostos aromáticos.

6.2. Recomendações

- a utilização de modelos alternativos, os quais possam levar em consideração outros fenômenos que não são contemplados pela equação cinética de Monod.
- Experimentos similares em campo, considerando as influências de variáveis ambientais.
- Comparação dos parâmetros cinéticos aeróbicos com parâmetros anaeróbicos de degradação do etanol, enfocando essa influência do nutriente, já que são as situações anaeróbicas predominantes em águas subterrâneas quando atingidas por acidentes com gasolina e seus derivados.
- Utilização de biologia molecular para melhor caracterização da biomassa quanto a diversidade e concentração, além de identificar as espécies de bactérias que estão degradando o etanol, bem como a atividade bacteriana.
- Realizar experimentos com outras concentrações de etanol e de nutrientes.

APÊNDICE I

Composição do meio Mineral Hunter's Base (MSB).

Tabela 3 - Composição do meio MSB (STAINER *et al.*, 1966)

Solução A	Solução C	Metais	Solução B	MSB
Na ₂ HPO ₄ - 141,2g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄ - 200g/L	ZnSO ₄ •7H ₂ O 10,95g/L	MgSO ₄ 14,45 g/L	Solução A: 40mL
KH ₂ PO ₄ - 136g/L		MnSO ₄ •7H ₂ O 1,54g/L	CaCl ₂ • 2H ₂ O 3,33g/L	Solução B: 20 mL
		FeSO ₄ •7H ₂ O 5,00g/L	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O 9,25mg/L	Solução C: 5mL
		Cu(NO ₃) ₂ • 6H ₂ O 392 mg/L	FeSO ₄ •7H ₂ O 99mg	
		Co(NO ₃) ₂ • 6H ₂ O 248 mg/L	Metais 44 50mL	
		Na ₂ B ₄ O ₇ •10H ₂ O 177.mg/L		

APÊNDICE II

cromatograma de uma amostra com curva de calibração do etanol

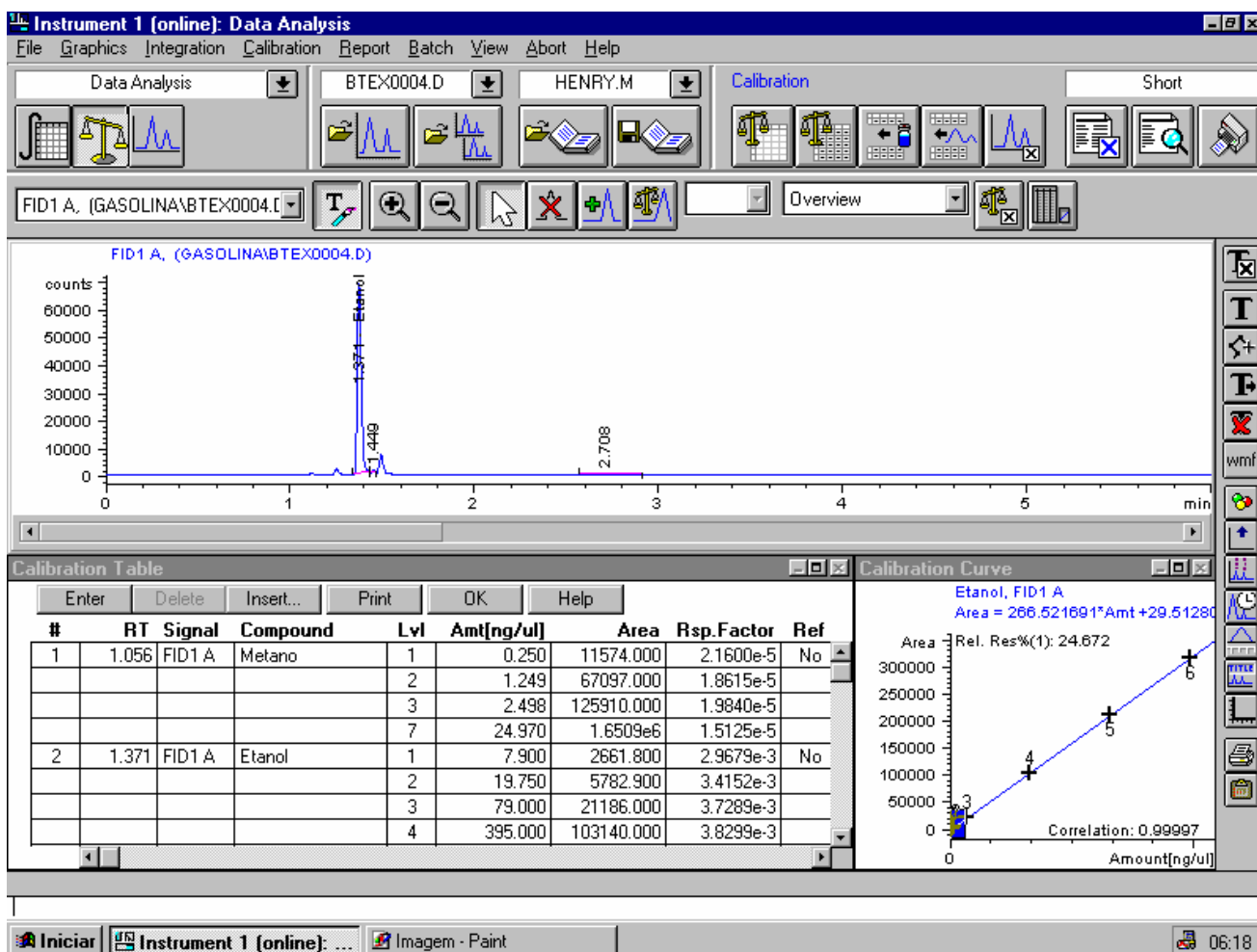


Figura 24 – Cromatograma de uma amostra com a curva de calibração do etanol.

APÊNDICE III

Condições de trabalho utilizadas no Headspace e no cromatógrafo gasoso.

Tabela 4 - Condições de trabalho utilizadas no Headspace HP7694.

Parâmetros	Valor (T°C)	Parâmetros	Valor (min.)	Parâmetros	Valor (psi)
Oven	75	Ciclo CG	15	Pressão de arraste	6,1
Loop	90	Equilíbrio do vial	3	Pressão no vial	19,9
Tr. Line	110	Pressurização	0,10		
		Loop	0,10		
		Equilíbrio do Loop	0,10		
		Injeção	0,1		

Tabela 5 - Condições de trabalho utilizadas no Cromatógrafo à gás HP5890.

Parâmetros	Valores (T°C)	Eventos Integração	Valores
Injetor A	190	Área rejeitada	50
Detector A	320	Altura do pico inicial	0,04
Oven	40 (3min)		
Taxa T°C/min	5.0/min		
Temp. final	120		

APÊNDICE IV

Dados do experimento de biodegradação **aeróbia** do etanol

Tabela 6 - Experimento de biodegradação aeróbia de 112,32 mg/L de etanol – sem nutriente.

Tempo (horas)	Amostra 1 (mg/L)	Amostra 2 (mg/L)	Amostra 3 (mg/L)	Média (mg/L)	Desvio Padrão
0	110,21	104,78	105,31	106,77	2,99
20	123,55	132,61	-	128,08	6,41
44	124,81	142,77	138,30	135,29	9,35
53	120,61	120,63	136,22	125,82	9,01
77	137,11	144,87	137,41	139,79	4,40
101	148,16	149,25	141,61	146,34	4,13
125	143,86	134,77	143,17	140,60	5,07
149	132,64	137,23	140,75	136,87	4,06
346	127,46	136,84	138,27	134,19	5,87
802	0,00	21,74	115,45	45,73	61,35

Tabela 7 - Experimento de biodegradação aeróbia de 112,32 mg/L de etanol –20% da concentração ideal mínima de nutriente.

Tempo (horas)	Amostra 1 (mg/L)	Amostra 2 (mg/L)	Amostra 3 (mg/L)	Média (mg/L)	Desvio Padrão
0	112,30	104,55	106,03	107,63	4,11
20	101,80	109,92	116,03	109,25	7,14
44	84,21	94,16	104,80	94,39	10,30
53	67,07	75,79	73,94	72,27	4,59
77	72,67	52,67	79,27	68,20	13,85
101	32,75	28,76	45,15	35,55	8,55
125	0,00	23,63	28,58	17,40	15,27
149	0,00	27,66	0,00	9,22	15,97
346	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
802	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 8 - Experimento de biodegradação aeróbia de 112,32 mg/L de etanol – concentração ideal de nutriente.

Tempo (horas)	Amostra 1 (mg/L)	Amostra 2 (mg/L)	Amostra 3 (mg/L)	Média (mg/L)	Desvio Padrão
0	99,33	106,37	100,51	102,07	3,77
20	99,28	91,62	113,01	101,30	10,84
44	31,76	23,95	23,44	26,38	4,67
53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
101	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
149	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
346	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
802	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 9 - Experimento de biodegradação aeróbia de 112,32 mg/L de etanol – tratamento controle.

Tempo (horas)	Amostra 1 (mg/L)	Amostra 2 (mg/L)	Amostra 3 (mg/L)	Média (mg/L)	Desvio Padrão
0	105,88	112,33	104,43	107,55	4,21
20	122,92	134,43	134,48	130,61	6,66
44	143,22	128,64	146,95	139,60	9,68
53	139,57	137,70	140,08	139,11	1,25
77	153,57	146,64	144,29	148,17	4,82
101	135,94	121,25	146,33	134,51	12,60
125	146,98	141,58	141,68	143,41	3,09
149	139,62	141,91	-	140,77	1,61
346	140,76	133,04	134,11	135,97	4,18
802	128,05	134,57	135,50	132,71	4,07

APÊNDICE V

Dados do experimento de biodegradação **anaeróbia** do etanol

Tabela 10 - Experimento de biodegradação anaeróbia de 1000,00 mg/L de etanol – tratamento controle.

Tempo (dias)	Amostra 1 mg/L	Amostra 2 mg/L	Amostra 3 mg/L	Média mg/L	Desvio Padrão
0	1408,28	1440,72	-	1424,50	22,95
7	1047,33	1107,35	1132,53	1199,907	99,53
15	1010,639	1069,023	1134,041	1071,234	61,73
28	1047,33	1107,35	1132,53	1095,737	43,77
32	1006,43	1081,29	-	1043,86	52,93
49	1154,41	1258,89	1103,28	1172,193	79,31
84	1115,064	1106,6	1114,3	1111,988	4,68

Tabela 11 - Experimento de biodegradação anaeróbia de 1000,00 mg/L de etanol – tratamento sem nutriente.

Tempo (dias)	Amostra 1 mg/L	Amostra 2 mg/L	Amostra 3 mg/L	Média mg/L	Desvio Padrão
0	1456,54	1378,27	1204,842	1346,55	128,81
7	1067,66	1047,216	1109,344	1074,74	31,66
15	973,9105	988,4646	10521052	1004,792	41,53
28	870,43	880,44-	863,43	871,4333	8,55
32	1080,11	1084,88	1029,70	1064,89	30,57
49	916,71	928,71	913,71	919,71	7,94
84	1046,945	1042,8	1053,9	1047,882	5,61

Tabela 12 - Experimento de biodegradação anaeróbia de 1000,00 mg/L de etanol – tratamento com 20% da concentração ideal mínima de nutriente.

Tempo (dias)	Amostra 1 mg/L	Amostra 2 mg/L	Amostra 3 mg/L	Média mg/L	Desvio Padrão
0	1369,03	1393,53	1417,10	1393,22	24,03
7	929,77	1030,25	993,87	984,6286	50,87
15	926,20	939,86	941,42	935,8292	8,37
28	737,59	701,30	803,20	747,3633	51,65
32	953,30	959,03	1014,34	975,56	33,71
49	784,43	801,30	758,63	781,4533	21,49
84	982,0286	930,3	950,5	954,2762	26,07

Tabela 13 - Experimento de biodegradação anaeróbia de 1000,00 mg/L de etanol – tratamento 100% da concentração ideal mínima de nutriente.

Tempo (dias)	Amostra 1 mg/L	Amostra 2 mg/L	Amostra 3 mg/L	Média mg/L	Desvio Padrão
0	1175,64	1373,28	1439,63	1329,52	137,33
7	1019,64	1072,62	1053,31	984,63	50,87
15	898,79	984,39	927,51	935,83	8,37
28	908,22	859,30	923,50	747,36	51,65
32	962,61	990,04	1047,38	1000,01	43,26
49	849,22	703,20	803,20	781,45	21,49
84	960,5798	830,89	793,84	861,7699	87,55

APÊNDICE VI

Tabelas do número de células/mL em função do tempo de degradação do etanol.

Tabela 14 - Crescimento bacteriano em função do tempo de degradação de 112,32 mg/L de etanol – tratamento controle.

Tempo (horas)	Amostra 1 (células/mL)	Amostra 2 (células/mL)	Amostra 3 (células/mL)	Média (células/mL)	Desvio padrão
0	$7,06 \times 10^6$	$7,05 \times 10^6$	$7,18 \times 10^6$	$7,10 \times 10^6$	$7,23 \times 10^4$
24	$1,23 \times 10^7$	$1,21 \times 10^7$	$1,17 \times 10^7$	$1,20 \times 10^7$	$3,06 \times 10^5$
48					
57					
81	$1,44 \times 10^7$	$1,51 \times 10^7$	$1,56 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$	$6,02 \times 10^5$
105					
129	$1,72 \times 10^7$	$1,71 \times 10^7$	$1,68 \times 10^7$	$1,70 \times 10^7$	$2,08 \times 10^5$
153					
350	$1,35 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7$	$1,30 \times 10^7$	$6,49 \times 10^5$

Tabela 15 - Crescimento bacteriano em função do tempo de degradação de 112,32 mg/L de etanol – tratamento sem adição de nutriente.

Tempo (horas)	Amostra 1 (células/mL)	Amostra 2 (células/mL)	Amostra 3 (células/mL)	Média (células/mL)	Desvio padrão
0					
24	$1,48 \times 10^7$	$1,38 \times 10^7$	$1,42 \times 10^7$	$1,43 \times 10^7$	$5,03 \times 10^5$
48	$1,82 \times 10^7$	$1,85 \times 10^7$	$1,87 \times 10^7$	$1,85 \times 10^7$	$2,52 \times 10^5$
57					
81	$2,68 \times 10^7$	$2,60 \times 10^7$	$2,51 \times 10^7$	$2,60 \times 10^7$	$8,50 \times 10^5$
105					
129	$3,46 \times 10^7$	$3,76 \times 10^7$	$3,28 \times 10^7$	$3,50 \times 10^7$	$2,42 \times 10^6$
153					
350	$3,70 \times 10^7$	$3,90 \times 10^7$	$3,50 \times 10^7$	$3,70 \times 10^7$	$2,00 \times 10^6$

Tabela 16 - Crescimento bacteriano em função do tempo de degradação de 112,32 mg/L de etanol – 20% da concentração ideal mínima de nutriente.

Tempo (horas)	Amostra 1 (células/mL)	Amostra 2 (células/mL)	Amostra 3 (células/mL)	Média (células/mL)	Desvio padrão
0	$1,26 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7$	$1,24 \times 10^7$	$1,24 \times 10^7$	$1,50 \times 10^5$
24	$2,13 \times 10^7$	$2,11 \times 10^7$	$2,14 \times 10^7$	$2,13 \times 10^7$	$1,53 \times 10^5$
48	$3,10 \times 10^7$	$3,09 \times 10^7$	$3,12 \times 10^7$	$3,10 \times 10^7$	$1,44 \times 10^5$
57					
81	$3,71 \times 10^7$	$3,75 \times 10^7$	$4,54 \times 10^7$	$4,00 \times 10^7$	$4,68 \times 10^6$
105					
129	$2,67 \times 10^7$	$2,54 \times 10^7$	$2,60 \times 10^7$	$2,60 \times 10^7$	$6,75 \times 10^5$
153	$2,41 \times 10^7$	$2,34 \times 10^7$	$2,46 \times 10^7$	$2,40 \times 10^7$	$6,38 \times 10^5$

Tabela 17 - Crescimento bacteriano em função do tempo de degradação de 112,32 mg/L de etanol – 100% da concentração ideal mínima de nutriente.

Tempo (horas)	Amostra 1 (células/mL)	Amostra 2 (células/mL)	Amostra 3 (células/mL)	Média (células/mL)	Desvio padrão
0	$1,78 \times 10^7$	$1,82 \times 10^7$	$1,81 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$	$2,22 \times 10^5$
24	$1,80 \times 10^7$	$1,77 \times 10^7$	$1,84 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$	$3,51 \times 10^5$
48	$3,67 \times 10^7$	$4,22 \times 10^7$	$4,12 \times 10^7$	$4,00 \times 10^7$	$2,93 \times 10^5$
57					
81	$6,10 \times 10^7$	$6,17 \times 10^7$	$6,03 \times 10^7$	$6,10 \times 10^7$	$7,00 \times 10^5$
105					
129	$9,97 \times 10^7$	$9,78 \times 10^7$	$9,94 \times 10^7$	$9,90 \times 10^7$	$1,03 \times 10^6$
153	$1,30 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7$	$1,38 \times 10^7$	$1,30 \times 10^7$	$7,31 \times 10^5$

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press, San Diego, California, 302 p. 1994.
- AECKERSBERG, F., BAK, F. AND WIDDEL, F. **Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium**. *Arch. Microbiol.* 156: 5-14. 1991.
- ARCEIVALA, S. J. **Wastewater treatment and disposal**. Marcel Dekker, New York. 2-90. 66p. 1981.
- ARINBASAROV, M.U.; KARPOV, A.V.; SELEZNEV, S.G.; GRISHCHENKOV, V.G. AND BORONIN, A.M. **Approaches to creation of bacterial consortium for efficient biorremediation of oil-contaminated soil**. Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium. Volume 4, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 523-528. 1997.
- ATLAS, R. & BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals And Applications**. 3rd Ed. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. 1946.
- AXELROD, R.; SEVERN, S.; STEIN, C.; STOLTE, L.M. AND SHORT, A. **Natural attenuation as an effective solvent plume management strategy**. Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium. Volume 1, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 111-116. 1997.
- BARBIERI, E. **Efeitos do LAS-C12 (Dodecil Benzeno Sulfonado de Sódio) no metabolismo e na capacidade de natação da tainha, *Mugil platanus* (Günther, 1880) (Perciformes, Mugilidae)**. Dissertação de Mestrado em Oceanografia Biológica - Universidade São Paulo (IO-USP). 2000.

- BATTERSBY, N.S. & WILSON, V. **Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge.** *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 433-439. 1989.
- BAUMGARTEN, M. G. Z. & POZZA, S. A. P. **Qualidade de águas – Descrição de parâmetros químicos referidos na legislação ambiental. 2001.**
- BELLER, H.R.; GRBIC-GALIC, D. AND REINHARD, M. **Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process.** *Applied And Environmental Microbiology*, 58(3): 786-793. 1992.
- BRATBAK, G. **Bacterial biovolume and biomass estimatimation.** *Applied And Environmental Microbiology*, 49(6): 1488-1493. 1985.
- BYRD, J. J. & COLWELL, R. R. **Microscopy applications for anayisis of environmental samples.** In. M. A. Levin, R. J. Seidler & Rogul, M. (eds.) *Microbial Ecology: Principles, Methods and Aplications.* McGraw-Hill, New York, pp. 93-112. 1992.
- CALDWELL, D.R. **Microbial Physiology and Metabolism.** Wm. C. Brown Communicatios, Inc, USA. 353 p. 1995.
- CARMOUZE, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudos e análises químicas.** São Paulo: Edgard Blücher: FAPESP. 254p. 1994.
- CETESB – **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Microbiologia de Lodos Ativados – Série Manuais.** São Paulo: CETESB. 23 p. 1991.
- CHAPRA, S. C. **Surface water-quality modeling.** McGraw-Hill. 1997.
- CHO, J.S.; WILSON, J.T. AND WEAVER, J.W. **Criteria for selection of intrinsic bioremediation for petroleum hydrocarbon plumes.** Fourth International In Situ and On-

Site Biorremediation Symposium. Volume 1, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 97-102. 1997.

COMISSÃO ORGANIZADORA DO RELATÓRIO ESTADUAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO. **Meio Ambiente e Desenvolvimento no Espírito Santo: relatório final.** 122p., 1992.

CORSEUIL, H.X. **Limitações da biomassa autóctone na degradação de compostos tóxicos em subsolos.** Revista Bio, 2: 46-56. 1994.

CORSEUIL, H.X. & WEBER, W.J. **Potential biomass limitations on rates of degradation of monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils.** Wat. Res., 28(6): 1415-1423. 1994.

CORSEUIL, H.X. & ALVAREZ, P.J.J. **Natural Bioremediation perspective for btx-contaminated groundwater in Brazil.** Rev. Microbiol., S. Paulo V.27, N.1, P. 43-50, 1996.

CORSEUIL, H.X. & ALVAREZ, P.J.J. **Natural bioremediation perspective for btx-contaminated groundwater in Brazil: Effect of ethanol.** Water Science Technology, V 34, N. 7-8 P.311-318, 1996.

CORSEUIL, H.X. & ALVAREZ, P.J.J. **Natural Bioremediation Perspective for BTX-Contaminated Groundwater in Brazil.** Wat. Sci.Tech., 34 (7-8): 311-318. 1996a.

CORSEUIL, H.X. & ALVAREZ, P.J.J. **Implications of the Presence of Ethanol on Intrinsic Bioremediation of BTX Plumes in Brasil.** Hazardous Waste and Hazardous Materials 13 (2): 213-221. 1996b.

- CORSEUIL, H.X. & ALVAREZ, P.J.J. **Natural Bioremediation of Aquifer Material Contaminated with Gasoline-Ethanol Mixtures.** Rev. Microbiol., São Paulo, 27(1)19-26. 1996c.
- CORSEUIL, H.X. AND P.J.J. ALVAREZ **Natural Bioremediation Perspective for BTX-Contaminated Groundwater in Brazil.** Proceedings 18th IAWQ Conference Biennial International Conference, Singapore, Conference Preprint Book 4, p 9-16. 1996d.
- CORSEUIL, H.X.; PRADO, M.A. & MARINS, M.D.M 1996. **Biorremediação Passiva de Águas Subterrâneas Contaminadas por Derramamentos de Gasolina.** 11º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, RJ, setembro. 1996.
- CORSEUIL, H.X. & MARINS, M.D. **Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave?** Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, 22, 50-54. 1997.
- CORSEUIL, H.X. **Biorremediação natural de aquíferos contaminados com derramamentos de gasolina.** Dissertação para Professor Titular, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 71p. 1997.
- CORSEUIL, H.X., HUNT, C.S.; SANTOS, R.C.F. & ALVAREZ, P.J.J. **The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation.** Water Research, 32, 2065-2072. 1998.
- CORSEUIL. H.X., SCHNEIDER, M., ROSÁRIO, M.. **Natural Attenuation Rates of Ethanol and BTEX compounds in Groundwater contaminated with gasohol.** Appropriate Environmental and Solid Waste Management and Technologies for developing countries. Volume 4. p. 2121-2128. 2002.
- COSTA, E. T. R. **Desenvolvimento de Metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável.** Seropédica, Rj. 81p. Dissertação (Mestrado Em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, 1999.

- COZZARELI, I.M.; HERMAN, J.S. AND BAEDECKER, M.J. **Fate of microbial metabolites in a coastal plain aquifer: The role of electron acceptors.** Env. Sci. Technol. 29, 458-469. 1995.
- DALTON H, STIRLING DI. **Co-metabolism.** Philosophical Transactions of the Royal Society of London B (Biological Sciences) 297:481–496. 1982.
- DUETZ W.A., MARQUES S., DE JONG C.,RAMOS J.L.,VAN ANDEL J.G. **Inducibility of the TOL catabolic pathway *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate in continuous cultures:evidence of carbon catabolite repression control.** J Bacteriol 1994;176:2354 –61.
- DUETZ W. A., MARQUES S.,WIND B.,RAMOS J.L.,VAN ANDEL J.G. **Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harboring pWW0 under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture.**Appl Environ Microbiol 1996;62:601 –6.
- EDWARDS, E.A. & GRBIC-GALIC. **Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions.** Applied And Environmental Microbiology, 58(8):2663-2666. 1992.
- FERNANDES, M. & CORSEUIL, H.X.. **Efeito potencial do etanol na solubilização dos BTX em águas subterrâneas contaminadas com gasolina.** Anais do VI Congresso Brasileiro de Geoquímica, Salvador, outubro/97, Vol. I, p 150-153. 1997.
- FINOTTI, A.R. & CORSEUIL, H.X.. **O uso de ações corretivas baseados no risco ambiental na remediação de aquíferos contaminados por vazamentos em postos de gasolina.** Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Foz do Iguaçu, em Setembro/97, p 2448-2452. 1997.

- FLATHMAN, P. E.; JERGER, D. E. & EXNER, J. H. **Biorremediation: Field Experience**. Lewis Publishers, 548p. 1994.
- FREITAS, A. L. S. **Uso racional da água subterrânea aplicado às ciências agrárias**. Brasília, Associação Brasileira De Educação Agrícola Superior, Ed. Supercor, 75p. 1997.
- GRADY, C. P. L., LIM, H. **Biological wastewater treatment: theory and application**. Marcel Dekker, New York. 1980.
- GRADY, C. P. LESLIE; DAIGGER, GLEN T; LIM, HENRY C. **Biological Wastewater treatment**. 2. ed. New York. Marcel Dekker, 1999.
- HOBBIE, J. E., DALEY, R.J., & JASPER, S. **Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy**. Applied and Environmental Microbiology (33), 1225-8. 1977.
- HUNT, C.S.; CRONKHITE, L.A.; CORSEUIL, H.X. & ALVAREZ, P.J.J. **Effect of Ethanol on Anaerobic Toluene Degradation in Aquifer Microcosms**. Proceedings of 213th ACS National Meeting, San Francisco, Abril,97, p 424-426. 1997.
- JONES, S.H. & ALEXANDER. **Kinetics of mineralization of Phenols in lake water**. Applied and Environmental Microbiology, 51(5):891-897. 1986.
- KING, L.K. & PARKER, B. **A simple, rapid method for enumerating total viable and metabolically active bacteria in groundwater**. Applied and Environmental Microbiology, 54(6):1630-1631. 1988.
- KLECKA, G.M. & MAIER, W.J. **Kinetics of microbial growth on Pentacholophenol**. Applied and Environmental Microbiology, 49(1):46-53. 1985.
- KORDA, A.; TENENTE, A.; SANTAS, P.; GIDARAKOS, E.; GUILLERME, M. & SANTAS R. **Biological remediation of oil spill of the Saronikos Gulf, Greece**. Fourth International

In Situ and On-Site Biorremediation Symposium. Volume 4, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 451-456. 1997.

LARSON, R. J. **Role of biodegradation kinetics in predicting environmental fate.** p. 67-86.
In A. W. Maki, K. L. Dickson, & J. Cairns, Jr. (ed.), Biotransformation and fate of chemicals in the aquatic environment. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1980

LIBELO, E.L.; STAUFFER, T.B.; GEER, M.A.; MACINTYRE, W.G. & BOGGS, J.M. **A field study to elucidate processes involved in natural attenuation.** Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium. Volume 1, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 23-28. 1997.

LINCOLN, R.; BOXSHALL, G. & CLARK, P. **A dictionary of ecology, evolution and systematics.** Second Edition Cambridge. University Press. 1998.

LOVANH, NANH; HUNT, CRAIG S. ; ALVAREZ, PEDRO J.J. **Effect of ethanol on BTEX biodegradation kinetics:aerobic continuous culture experiments.** Water Research 36 (2002)3739 –3746. 2002.

LUBBERDING, H. J. **Applied anaerobic digestion.** In: *International course on anaerobic treatment.* Wageningen Agricultural University / IHE Delf. Wageningen, 17-28 Jul 1995.

McCARTY, P.L. **Energetics and bacterial growth.** Presented At The 5th Rudolf Research Conference, Rutgers, The State University, New Brunswick, Nj, July 2, 1969.

McCARTY, P.L. Stoichiometry of biological reactions. **Toward a unified concept of biological waste treatment design.** International conference, Atlanta, Georgia, 85-151p. 1972.

McCARTY, P.L. **Stoichiometry of biological reactions.** Progress in Water Technology, 7: 157-165. 1975.

- METCALF & EDDY. **Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse**. Metclaf & Eddy, Inc. 3 ed, 1334 pp. 1991.
- MONOD, J. **The growth of bacterial cultures**. Annu. Rev. Microbiol. **3**: 371–394. 1949.
- MONTGOMERY, M.T.; BOYD, T.J.; SPARGO, B.J.; COFFIN, R.B. & MUELLER, J.G. **Bacterial productivity in BTEX- and PAH- contaminated aquifers**. Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium. Volume 4, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 125-130. 1997.
- NYHOLM N, MADSEN T. **Comments on guidance document for the interpretation of biodegradability data by BKH consulting engineers**. 1995.
- NORLAND, S.; HELDAL, M.; TUMYR, O. **On the relatio between dry mattet and volume of bacteria**. Microb. Ecol. 13:95-101. 1987.
- NRIAGU, J. O. & LAKSHMINARAYANA, J. S. S. **Aquatic Toxicology and Water Quality Management**. Vol. 22. John Wiley & Sons, Inc. 1989.
- PETERSEN, H. & LUXTON, M. **A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes**. *Oikos*, 39, 287–388. 1982
- PELCZAR, Michael Joseph; REID, Roger D. (Roger Delbert); CHAN, Eddie Chin Sun. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980-1981. 1072p.)
- PELCZAR, Michael Joseph; CHAN, Eddie Chin Sun; KRIEG, Noel R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, c1997. 2v.

- POWERS, S.E.; HUNT, C.S.; HEERMANN, S.E.; CORSEUIL, H.X.; RICE, D.; ALVAREZ, J.J. The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasoline. **CRC Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 79-123, 2001.
- REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B. & TUNDISI, J. G. **Águas doces no Brasil: Capital Ecológico, uso e conservação**. Instituto de Estudos Avançados da USP. Academia Brasileira de Ciências. São Paulo: Escrituras Editora, 717p. 1999.
- ROBINSON, J.A. & TIEDJE, J.M. **Nonlinear estimation of Monod growth kinetics parameters from a single substrate depletion curve**. Applied and Environmental Microbiology, 45(5):1453-1458. 1983.
- SAWYER, C.N, MCCARTY, P.L. **Chemistry for environmental engineering** 3. ed. New York, Mc Graw-Hill, Inc. 532 p. 1978.
- SIERACKI, M.E.; JOHNSON, P.W.; SIEBURTH, J.M. **Detection, enumeration, and sizing of planktonic bacteria by image-analyzed epifluorescence microscopy**. Applied and Environmental Microbiology, 49(4):799-810. 1985.
- SIMKINS S, ALEXANDER M. **Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density**. Applied and Environmental Microbiology 47:1299–1306. 1984.
- SILVA, M. L. B. da. **Efeito Do etanol na cinética de degradação aeróbica de benzeno e tolueno por pseudomonas putida f1**. Dissertação de mestrado em Engenharia Ambiental - Universidade Federal de Santa Catarina. 1998.
- STANIER, R.Y., PALLERONI, N.J. & DUODORFF, M. **The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study**. J. Gen. Microbiol., 43: 159-271. 1966.

SUBBA-RAO, R. V., H. E. RUBIN, & M. ALEXANDER. **Kinetics and extent of mineralization of organic chemicals at trace levels in freshwater and sewage.** Appl. Environ. Microbiol. 43:1139-1150. 1982.

WALTER, M.V. & CRAWFORD, R.L. **Manual of environment microbiology.** ASM Press, Washington, D.C. 894p. 1997.

WATANABE, K. **Microorganisms relevant to bioremediation.** Current Opinion in Biotechnology. V. 12(3), p. 237-41, jun 2001.

WIGGINS, B. A., JONES, S.H. & ALEXANDER, M. **Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments.** Applied and Environmental Microbiology, 53(4):791-796. 1987.

YANG, S. T.; OKOS, M. R. **Kinetic study and mathematical modeling of methanogenesis of acetate using pure culture of methanogens.** Biotechnology and bioengineering, v.30, p. 661-667, 1987.

ZHANG, T. GUAY, M. **Adaptative Nonlinear Observers of Microbial Growth Process.** Journal of Process Control, v. 12, p. 633-643, 2002.